

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Redukce nadměrného ředění vzorku při převodu frakcí ve
dvoudimenzionální kapalinové chromatografii

Diplomová práce

2023

Bc. Iva Harnachová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Iva Harnachová**
Osobní číslo: **C21424**
Studijní program: **N0531A130030 Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Redukce nadměrného ředění vzorku při převodu frakcí ve dvoudimenzionální kapalinové chromatografii**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši věnující se převodu eluátu vytékající z kolony v první dimenzi na kolonu v druhé dimenzi ve dvoudimenzionální kapalinové chromatografii. Zaměřte se na používané modulátory, rozmývání píků během převodu, a možnosti zmenšení ředění analytů.
2. V experimentální části otestujte a porovnejte vliv gradientu druhé dimenze na rozmývání píků s využitím zachytávacích smyček nebo kolonek. Využijte jak modulátor využívající dvou smyček, tak třismyčkový modulátor.
3. Dosažené výsledky kriticky zhodnoťte a porovnejte se současným stavem poznání.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Tomáš Hájek, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2023**
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Redukce nadměrného ředění vzorku při převodu frakcí ve dvoudimenzionální kapalinové chromatografii jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 5.5.2023

Iva Harnachová v. r.

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat vedoucímu práce panu Ing. Tomáši Hájkovi, Ph.D. za mnoho hodin odborné konzultace, cenné rady a připomínky, vstřícnost a trpělivost. Dále děkuji panu doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D. za jeho pomoc při aplikaci izoelektrické fokusace. Děkuji mé rodině za jejich podporu a pomoc během celé doby mého studia.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá modulátory pro dvoudimenzionální kapalinovou chromatografii a možnostmi, jak snížit rozmývání píků při převodu frakcí z první do druhé dimenze. Bylo vyzkoušeno několik druhů modulátorů: duo čtyřcestný dvoupolohový ventil se zachytávacími smyčkami nebo kolonkami, modulátor umožňující ředění na koloně a třísmyčkový ventil se zachytávacími smyčkami nebo kolonkami. U těchto modulátorů byl zkoumán vliv počáteční koncentrace silnějšího elučního činidla v gradientu druhé dimenze na píkovou kapacitu. Dále byla testována proveditelnost izoelektrické fokusace při použití třísmyčkového modulátoru.

KLÍČOVÁ SLOVA

Dvourozměrná kapalinová chromatografie, modulace ředěním na koloně, třísmyčkový modulátor, píkova kapacita, izoelektrická fokusace

TITLE

Reduction of excessive dilution during fraction transfer in two-dimensional liquid chromatography

ANNOTATION

The thesis deals with modulators for two-dimensional liquid chromatography and the possibilities to reduce peak distortion by converting fractions from the first to the second dimension. Several types of modulators have been tested: a two-position/four-port duo valve with sampling loops or columns, a modulator allowing dilution on a column, and a three-loop valve with sampling loops or columns. The effect of the initial concentration of the stronger eluent in the second dimension gradient on the peak capacity was investigated for all modulators. Furthermore, the feasibility of isoelectric focus of fraction using a three-loop valve has been tested.

KEYWORDS

Two-dimensional liquid chromatography, at-column dilution modulator, three-loop modulator, peak capacity, isoelectric focus

Obsah

Seznam ilustrací.....	11
Seznam tabulek.....	14
Seznam zkratk a symbolů.....	15
Úvod.....	18
1 Teoretická část.....	19
1.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	19
1.2 Dvourozměrná kapalinová chromatografie.....	21
1.3 Detektory a vyhodnocení signálu ve 2D-LC.....	24
1.4 Terminologie dvourozměrné kapalinové chromatografie.....	26
1.5 Druhy dvourozměrné kapalinové chromatografie.....	26
1.6 Výběr a ortogonalita separačních systémů.....	29
1.6.1 Reverzní fáze (RP).....	33
1.6.2 Chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC).....	34
1.7 Účinnost separace.....	34
1.8 Modulátory.....	35
1.8.1 Nejstarší typy modulátorů.....	37
1.8.2 Paralelní kolony ve druhé dimenzi.....	40
1.8.3 Modulace rozpouštědlem.....	42
1.8.3.1 Pasivní modulace rozpouštědlem.....	43
1.8.3.2 Aktivní modulace rozpouštědlem.....	44
1.8.3.3 Pulzně-eluční modulace.....	45
1.8.3.4 Modulace ředěním na koloně.....	47
1.8.4 Modulace s využitím teploty.....	48
1.8.4.1 Modulátor s vakuovým odpařováním.....	48

1.8.4.2	Rozhraní s odpařovací membránou	49
1.8.4.3	Tepelná modulace.....	50
1.8.4.4	Podélná on-column tepelná modulace.....	52
1.8.4.5	Modulace zachytáváním za studena	53
1.8.5	Modulace stacionární fázi	54
1.8.6	Budoucnost vývoje modulátorů	56
1.9	Gradientová eluce ve dvourozměrné kapalinové chromatografii	56
1.10	Využití dvourozměrné kapalinové chromatografie.....	59
2	Experimentální část.....	61
2.1	Přístroje a zařízení.....	61
2.2	Chemikálie	63
2.3	Pracovní podmínky	64
2.3.1	Podmínky 2D-LC separace	64
2.3.2	Gradientsy mobilních fází	66
2.3.3	Podmínky při zapojení modulace ředěním na koloně.....	68
2.4	Pracovní postupy.....	70
2.4.1	Příprava 10 mM roztoku octanu amonného ve vodě	70
2.4.2	Příprava 10 mM octanu amonného v acetonitrilu.....	70
2.4.3	Příprava standardů fenolických kyselin	71
2.5	Experimentální zpracování dat.....	71
3	Výsledky a diskuze	72
3.1	Vliv počáteční koncentrace gradientu ve druhé dimenzi.....	73
3.1.1	Duo čtyřcestný dvoupolohový ventil	73
3.1.1.1	Zachytávací smyčky	73
3.1.1.2	Zachytávací kolonky	75

3.1.2	Modulace ředěním na koloně.....	82
3.1.3	Třísmyčkový modulátor.....	85
3.1.3.1	Princip fungování třísmyčkového modulátoru	85
3.1.3.2	Třísmyčkový modulátor se zachytávacími smyčkami	87
3.1.3.3	Třísmyčkový modulátor se zachytávacími kolonkami.....	89
3.2	Porovnání modulátorů podle píkových kapacit	91
3.3	Vliv gradientu mobilní fáze ve druhé dimenzi na výšku píku	93
3.4	Úprava frakce mezi první a druhou dimenzí pomocí TSM	95
3.4.1	Zapojení kapilární elektroforézy k TSM.....	95
3.4.2	Vytlačení frakce ze smyčky do kapiláry elektroforézy.....	98
3.4.3	Vytlačení roztoku z kapiláry elektroforézy do zachytávací smyčky ..	99
3.4.4	Propojení TSM, kapilární elektroforézy a kolony druhé dimenze....	100
3.4.5	Izoelektrická fokusace	103
4	Závěr	106
5	Použitá literatura	107
6	Seznam příloh.....	114

Seznam ilustrací

Obrázek 1: Schéma dvourozměrné kapalinové chromatografie	21
Obrázek 2: Osmicestný ventil se dvěma zachytávacími smyčkami.	22
Obrázek 3: První příklad podvzorkování eluátu z první dimenze.	23
Obrázek 4: Druhý příklad podvzorkování..	23
Obrázek 5: Ideální čas vzorkování, kdy se oddělí všechny tři látky.....	24
Obrázek 6: Konturový dvoudimenzionální chromatogram a izometrický chromatogram dvourozměrné kapalinové chromatografie.	25
Obrázek 7: Ukázky systémů ortogonalit.....	29
Obrázek 8: Znárodnění pikové kapacity pro jednorozměrnou a dvourozměrnou kapalinovou chromatografii.	35
Obrázek 9: Osmicestný dvupolohový ventil se dvěma zachytávacími smyčkami.	37
Obrázek 10: Nákres deseticestného dvupolohového ventilu se dvěma zachytávacími smyčkami.	38
Obrázek 11: Duo čtyřcestný dvupolohový ventil se dvěma zachytávacími smyčkami.	39
Obrázek 12: Dva šesticestné dvupolohové ventily se dvěma zachytávacími smyčkami.	39
Obrázek 13: Dvupolohový dvanácticestný ventil se třemi smyčkami a dvěma kolonami ve druhé dimenzi.....	40
Obrázek 14: Schéma dvou deseticestných ventilů se dvěma zachytávacími smyčkami a dvěma kolonami ve druhé dimenzi.....	41
Obrázek 15: Pasivní modulace rozpouštědlem.....	43
Obrázek 16: Aktivní modulace rozpouštědlem.	44
Obrázek 17: Průběh pulzně-elučního gradientu v první dimenzi během separace.....	45
Obrázek 18: Spojení pulzní eluční modulace a pevné modulace rozpouštědlem..	46
Obrázek 19: Modulace ředěním na koloně.	47
Obrázek 20: Zapojení modulátoru s vakuovým odpařováním do dvourozměrné kapalinové chromatografie	48

Obrázek 21: Zapojení odpařovací membrány mezi první dimenzi a duo čtyřcestný dvoupolohový ventil.	50
Obrázek 22: Tepelná modulace.	51
Obrázek 23: Konstrukce tepelné on-column podélné modulace.	52
Obrázek 24: Zapojení modulace zachytáváním za studena do separačního systému.	53
Obrázek 25: Asistovaná modulace stacionární fázi.	55
Obrázek 26: Průběhy jednotlivých typů gradientů v LC×LC.	57
Obrázek 27: Průběh gradientů mobilních fází v první a ve druhé dimenzi.	67
Obrázek 28: Modulace ředěním na koloně.	68
Obrázek 29: Gradient acetonitrilu v mobilní fázi druhé dimenze při použití modulace ředěním na koloně.	70
Obrázek 30: 2D chromatogram fenolických kyselin s gradientem 0–40 % acetonitrilu v mobilní fázi pro druhou dimenzi s modulátorem AG-smyčky.	74
Obrázek 31: 2D chromatogram fenolických kyselin při zapojení AG-trapHILIC po směru a s gradientem 0–40 % ACN ve druhé dimenzi.	77
Obrázek 32: 2D chromatogram fenolických kyselin při gradientu 0–40 % ACN a zapojení AG-trapHILIC v protisměru.	77
Obrázek 33: Separace fenolických kyselin při zapojení AG-trapC18-5 po směru a s gradientem MF(B) _{D2} 0–40 %.	78
Obrázek 34: 2D chromatogram fenolických kyselin při zapojení AG-trapC18-5 v protisměru a s gradientem acetonitrilu 0–40 % v mobilní fázi.	78
Obrázek 35: 2D chromatogram fenolických kyselin při zapojení AG-trapC18-20 po směru. Nastavení gradientu acetonitrilu bylo od 0 do 40 %.	79
Obrázek 36: 2D chromatogram fenolických kyselin s nastaveným gradientem 0–40 % ACN a při zapojení AG-trapC18-20 v protisměru.	79
Obrázek 37: Výsledný 2D chromatogram fenolických kyselin při zapojení ACD a při nastaveném gradientu 0–40 % acetonitrilu v mobilní fázi pro druhou dimenzi.	83
Obrázek 38: Znázornění jednotlivých cyklů třísmýčkového modulátoru.	85
Obrázek 39: Konstrukce a jednotlivé pozice třísmýčkového modulátoru.	86

Obrázek 40: 2D chromatogram fenolických kyselin při zapojení TSM a nastaveném gradientu 0–40 % acetonitrilu v mobilní fázi druhé dimenze.....	88
Obrázek 41: 2D chromatogram fenolických kyselin získaný po separaci se zapojeným TSM se třemi zachytávacími kolonkami C18-20 a gradientem acetonitrilu 0–40 % v mobilní fázi.....	90
Obrázek 42: Závislost píkovej kapacity ve druhé dimenzi na počáteční koncentraci acetonitrilu v mobilní fázi pro všechny testované modulátory a zachytávací zařízení.	92
Obrázek 43: Závislost poměru odstupu signálu od šumu na počáteční koncentraci acetonitrilu v mobilní fázi pro druhou dimenzi.	94
Obrázek 44: Konstrukce TSM modulátoru po zkrácení spojovacích kapilár a reálné zapojení třísmýčkového modulátoru, injekční pumpy a kapilární elektroforézy. .	96
Obrázek 45: Propojení třísmýčkového modulátoru, injekční pumpy, dvupolohového deseticestného ventilu z PEEK materiálu a kapilární elektroforézy.	97
Obrázek 46: Závislost ploch píků kyseliny protokatechuové na čase působení tlaku dusíku 5 bar.....	102
Obrázek 47: Závislost ploch píků kyseliny <i>p</i> -kumarové na čase působení tlaku dusíku 5 bar.....	102
Obrázek 48: Záznam signálu kyseliny protokatechuové a kyseliny <i>p</i> -kumarové při aplikaci napětí -20 kV v různém čase, kdy na injekční pumpě byl průtok při vytlačování kapaliny z kapiláry do cely detektoru nastaven na 50 µl/min.....	104
Obrázek 49: Záznam z DAD detektoru v kapilární elektroforéze bez a po izoelektrické fokusaci vzorku kyseliny protokatechuové a <i>p</i> -kumarové.	105

Seznam tabulek

Tabulka 1: Seznam zkratk používaných ve dvourozměrné kapalinové chromatografii.....	26
Tabulka 2: Význam jednotlivých symbolů použitých v Tabulce 3.	31
Tabulka 3: Možné kombinace separačních systémů.....	32
Tabulka 4: Seznam použitých standardů fenolických kyselin pro separaci a jejich absorpční maxima λ_{MAX}	64
Tabulka 5: Průtoky mobilní fáze ve druhé dimenzi při použití různých typů modulátorů se zachytávacími smyčkami nebo kolonkami.	65
Tabulka 6: Průběh gradientu mobilní fáze v první dimenzi.	67
Tabulka 7: Změna koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi ve druhé dimenzi během jedné separace.	68
Tabulka 8: Příklad nastavení gradientu acetonitrilu v rozsahu od 10 do 50 % v mobilní fázi pro druhou dimenzi při zapojení modulace ředěním na koloně.	69
Tabulka 9: Výsledky separace při použití duo čtyřcestného dvoupolohového ventilu se dvěma zachytávacími smyčkami.	75
Tabulka 10: Výsledky při zapojení duo čtyřcestného dvoupolohového ventilu se dvěma trapovacími HILIC kolonkami, C18-5 kolonkami nebo C18-20 kolonkami.	80
Tabulka 11: Výsledky separace při zapojení modulace ředěním na koloně.....	84
Tabulka 12: Výsledky separace s využitím třísmyčkového modulátoru se třemi zachytávacími smyčkami bez aplikované izoelektrické fokusace na jednotlivé frakce.	89
Tabulka 13: Výsledky separace se zapojeným třísmyčkovým modulátorem a třemi trapovacími kolonkami C18 o délce 20 mm.	91

Seznam zkratk a symbolů

ACD	modulace ředěním na koloně (At-Column Dilution modulator)
ACN	acetonitril
AG	duo čtyřcestný dvoupolohový ventil
AG-smyčky	duo čtyřcestný dvoupolohový ventil se dvěma zachytávacími smyčkami
AG-trapC18-5	duo čtyřcestný dvoupolohový ventil se dvěma trapovacími kolonkami s C18 stacionární fází o rozměru 2,1×5 mm
AG-trapC18-20	..	duo čtyřcestný dvoupolohový ventil se dvěma trapovacími kolonkami s C18 stacionární fází o rozměru 20×4 mm
AG-trapHILIC	...	duo čtyřcestný dvoupolohový ventil se dvěma trapovacími kolonkami naplněné silikagelem
A_{org}	počáteční koncentrace organické složky v gradientu mobilní fáze
A_{pik}	plocha píku
ASM	aktivní modulace rozpouštědlem (Active Solvent Modulation)
B	strmost gradientu
CT	modulace zachytáváním za studena (Cold Trapping)
1D	první dimenze ve dvourozměrné kapalinové chromatografii
2D	druhá dimenze ve dvourozměrné kapalinové chromatografii
DAD	detektor diodového pole (Diode Array Detector)
1D-LC	jednorozměrná kapalinová chromatografie
2D-LC	dvourozměrná kapalinová chromatografie
EMM	modulátor s odpařovací membránou (Evaporate Membrane Modulation)
FIF	plný gradient (Full In Fraction gradient)
FK	fenolické kyseliny
F_m	průtok mobilní fáze
FSM	pasivní modulace rozpouštědlem (Fixed Solvent Modulation)
h	výška píku

h_s	výška šumu
HILIC	chromatografie hydrofilních interakcí (H ydrophilic I nteraction L iquid C hromatography)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (H igh P erformance L iquid C hromatography)
LC×LC	„comprehensive” dvourozměrná kapalinová chromatografie
LC-LC	„heart-cutting” dvourozměrná kapalinová chromatografie
LOCTM	podélná on-column tepelná modulace (L ongitudinal O n- C olumn T hermal M odulation)
MF(A) _{D1}	mobilní fáze (A) v první dimenzi
MF(B) _{D1}	mobilní fáze (B) v první dimenzi
MF(A) _{D2}	mobilní fáze (A) ve druhé dimenzi
MF(B) _{D2}	mobilní fáze (B) ve druhé dimenzi
n_p	píková kapacita
NP	chromatografie na normální fázi (N ormal- P hase)
NP×RP	„comprehensive” dvourozměrná kapalinová chromatografie s normální fází v první dimenzi a reverzní fází ve druhé dimenzi
PE	pulzní eluční modulace (P ulsed E lution)
PEEK ventil	deseticestný dvoupolohový ventil vyrobený z nevodivého materiálu polyetheretherketonu
RP	chromatografie na reverzní fázi (R eversed- P hase)
RP×HILIC	„comprehensive” dvourozměrná kapalinová chromatografie s reverzní fází v první dimenzi a chromatografií hydrofilních interakcí v dimenzi druhé
RP×RP	„comprehensive” dvourozměrná kapalinová chromatografie na reverzních fázích
RP×SEC	„comprehensive” dvourozměrná kapalinová chromatografie s reverzní fází v první dimenzi a chromatografií sterické výluky ve druhé dimenzi
SEC	chromatografie sterické výluky (S ize E xclusion C hromatography)

- SEC×RP „comprehensive” dvourozměrná kapalinová chromatografie s chromatografií sterické vyluky v první dimenzi a reverzní fází ve druhé dimenzi
- SIF segmentový gradient (**S**egmented **I**n **F**raction gradient)
- S/N odstup signálu od šumu (**S**ignal to **N**oise)
- SPAM asistovaná modulace stacionární fází (**S**tationary-**P**hase-**A**ssisted **M**odulation)
- TM tepelná modulace (**T**hermal **M**odulation)
- t_N čas aplikace dusíku
- TSM třísmýčkový modulátor
- UHPLC ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (**U**ltra-**H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography)
- VEI modulátor s vakuovým odpařováním (**V**acuum **E**vaporation **I**nterface)
- V_G objem gradientu
- w šířka píku při základně
- $w_{1/2h}$ šířka píku v polovině jeho výšky
- λ_{MAX} vlnová délka, při které má látka největší absorbanční
- φ_{org} konečná koncentrace organické složky v gradientu mobilní fáze

Úvod

Kapalinová chromatografie v jednokolonovém uspořádání často nestačí na rozseparování všech látek v komplexních vzorcích. Z tohoto důvodu se v posledních letech věnuje značná pozornost dvourozměrné kapalinové chromatografii. Tato separační metoda využívá dvě kolony, které rozdělují látky na základě odlišných fyzikálně-chemických vlastností. Vzorek je podroben separaci nejprve na jedné a posléze na druhé koloně. Díky tomu je větší šance, že se sloučeniny rozdělí do jednotlivých píků.

Důležitou součástí dvourozměrné kapalinové chromatografie je modulátor, který umožňuje vznik frakcí z eluátu získaného po separaci v první dimenzi a jejich převod na druhou kolonu. Existuje celá řada modulátorů umožňující převod frakce z první do druhé dimenze. Modulátory, které se řadí mezi pasivní, nařadí frakci (sloučeniny) při převodu mezi dimenzemi. V důsledku toho se zmenší odezva detektoru a dochází ke snížení mez detekce, případně se analyty o nízké koncentraci ani nedetekují. Proto je snaha zvýšit výšku píku a odstup signálu od šumu pomocí aktivních modulátorů, které umožňují zakoncentrování frakce před další separací na druhé koloně.

V této práci byl pro separace využit jeden z nejčastěji využívaných typů rozhraní, a to duo čtyřcestný dvoupolohový ventil opatřený zachytávacími smyčkami nebo kolonkami, a dále modulace ředěním na koloně. Vliv těchto modulátorů na rozmývání píků ve druhé dimenzi bude porovnáván s novým třísmyčkovým modulátorem, u kterého je možnost aplikovat izoelektrickou fokusaci pro zakoncentrování frakce z první dimenze.

1 Teoretická část

1.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) se řadí mezi separační metody, jejíž principem je rozdělení směsi látek na základě rozdílné distribuce sloučenin mezi dvě fáze, a to stacionární a mobilní fází. Jako stacionární fáze, se používá pevná látka nebo i kapalina, která se kotví na pevný nosič. Stacionární fáze je nejčastěji tvořena malými, kulatými a sférickými částicemi, které jsou uloženy v chromatografické koloně. Mobilní fází je kapalina, většinou se jedná o vodu nebo směs organických rozpouštědel, a ta je čerpána přes kolonu za konstantního průtoku.

Vzorek lze dávkovat ručně, ale častěji je dávkován pomocí automatického dávkovače vzorku ovládaným softwarem. Oba dávkovací způsoby využívají šesticestný dvoupolohový ventil se smyčkou o přesném objemu. Ventil funguje tak, že v jedné pozici vzorek protéká smyčkou, která se jím plní. Po naplnění smyčky se ventil přepne do druhé pozice, mobilní fáze protéká přes smyčku a vymývá vzorek na chromatografickou kolonu. Při ručním dávkování lze do chromatografu nadávkovat pouze objem, který je daný velikostí smyčky, kdežto použitím automatického dávkovače lze nadávkovat i menší objemy než objem smyčky.

Po nadávkování vzorku na kolonu dojde k interakci látek ve vzorku se stacionární fází a jednotlivé látky se zadržují na koloně. Látky se váží různou silou na sorbent, což zaručí jejich rozdělení. Tokem mobilní fáze jsou jednotlivé rozdělené složky postupně vymývány z kolony na detektor, kterým nejčastěji bývá spektrofotometrický, fluorescenční, vodivostní nebo i hmotnostní spektrometr. Výsledný záznam, chromatogram, udává závislost měřené veličiny na retenčním čase, kdy jsou signály jednotlivých látek zobrazeny ve formě píků. Píky mají při ideální separaci symetrický, úzký a vysoký tvar odpovídající rozdělení dle Gaussovy křivky.

Separace může probíhat za izokratických podmínek, což znamená, že podmínky se po celou dobu separace nemění. Je také možné zvolit gradientovou eluci, při které dochází ke změně jedné nebo více parametrů separace s časem.

Gradientová eluce může být vytvořena pomocí rostoucí teploty, změnou průtoku mobilní fáze nebo změnou koncentrací jednotlivých složek v mobilní fázi. Nejčastěji se využívá gradient mobilní fáze, kdy dochází ke zvyšování koncentrace rozpouštědla s vyšší eluční silou. Výhodou použití gradientové eluce je, že se získá rychlejší separace s lepším rozlišením a píkovou kapacitou, protože dochází ke kompresi píků. Konec píku se eluuje v mobilní fázi s vyšší eluční silou a má tendenci dohánět čelo píku [1].

Účinnost separace při použití izokratické i gradientové eluce je hodnocena různými parametry. Jedním z nich je píková kapacita, n_p . Veličina udává maximální počet píků, které se rozdělí na základní linii při rozlišení $R = 1,5$ za určitý časový úsek. Píková kapacita při gradientové eluci se vypočítá podle rovnice (1):

$$n_p = 1 + \frac{t}{w} \quad (1)$$

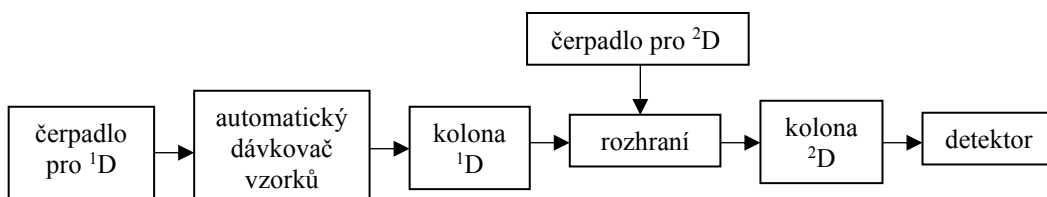
kde t je čas separace a w je průměrná šířka píku při základně.

V analytické chemii je trend analýzy zrychlovat, zvyšovat jejich účinnost a dosahovat lepšího rozlišení píků. Vyšší účinnost separace se dosáhne zmenšením částic stacionární fáze na méně než 2 μm , ale to způsobuje zvýšení tlaku na koloně. Klasická instrumentace pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii neumožňuje separace na kolonách naplněných sférickými částicemi o této velikosti, protože není přizpůsobená separacím za vyššího tlaku než 40 MPa. Zrychlení analýz s sebou přinesla ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC), která umožňuje separaci za vyššího tlaku, až 100 MPa [1].

1.2 Dvourozměrná kapalinová chromatografie

Jednorozměrná vysokoúčinná kapalinová chromatografie a ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie dosahují vysokých separačních účinností, ale ani to nestačí pro separaci všech složek komplexních vzorků, jako jsou například potraviny nebo biologické vzorky. Stovky látek ve vzorku mohou při separaci pomocí HPLC nebo UHPLC koeluovat, a tedy se nerozdělí. Pravděpodobnost koeluace se zvyšuje s počtem analyzovaných složek ve vzorku a s podobností fyzikálně-chemických vlastností látek [1]. Proto se v 70. letech minulého století začala rozvíjet moderní kolonová dvourozměrná (dvoudimenzionální) kapalinová chromatografie (2D-LC), která má za úkol v ideálním případě rozdělit všechny analyty v komplexních vzorcích [2].

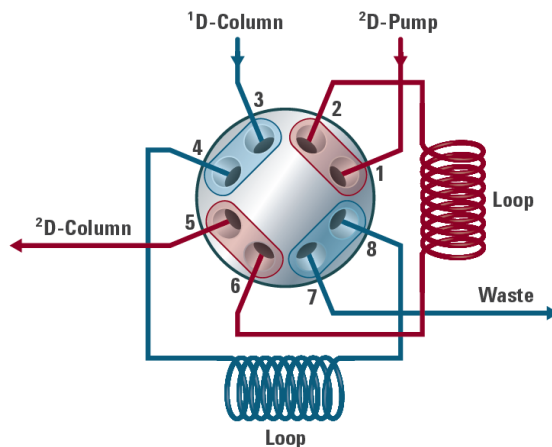
Dvoudimenzionální kapalinová chromatografie je separační metoda, kdy se dvě jednorozměrné kapalinové chromatografie zapojí za sebe, jak je znázorněno na Obrázku 1.



Obrázek 1: Schéma dvourozměrné kapalinové chromatografie.

Princip separace spočívá v tom, že vzorek je nadávkován na kolonu v první dimenzi (1D). Látky ve vzorku interagují se stacionární a mobilní fází a jsou postupně vymývány z kolony. Dochází tak k první separaci látek ve vzorku. Eluát z první dimenze pokračuje do rozhraní, kde se rozdělí do frakcí. Jednotlivé frakce jsou poté vymyty mobilní fází do druhé dimenze (2D) a jsou rozděleny na druhé koloně. První dimenze rozděluje látky na základě jedné vlastnosti, například podle velikosti molekuly, a druhá dimenze rozděluje sloučeniny podle druhé vlastnosti, například podle náboje. Když obě dvě dimenze separují látky na základě jiných vlastností, tak se ve druhé dimenzi oddělí i ty látky, které se po první separaci nerozdělily nebo se rozdělily pouze částečně [2].

Pro převod eluátu z první do druhé dimenze se používá rozhraní neboli modulátor. Nejčastěji to bývá osmi- nebo deseticestný dvoupolohový ventil se dvěma zachytávacími smyčkami (Obrázek 2) [1].

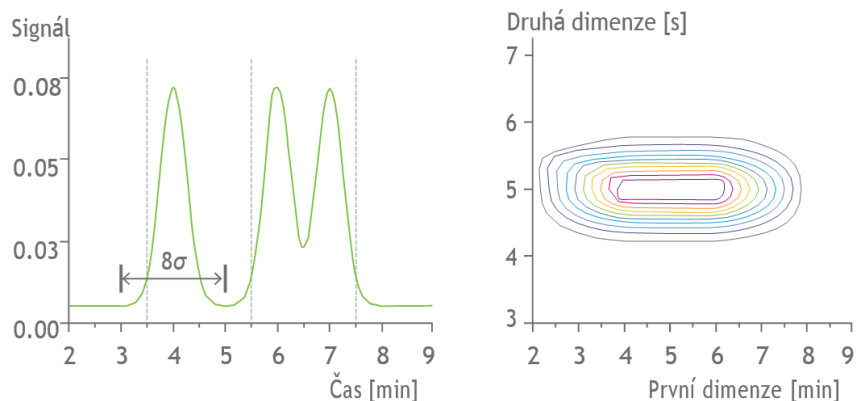


Obrázek 2: Osmicestný ventil se dvěma zachytávacími smyčkami [2].

Proces, kdy se převádí eluát z první do druhé dimenze, se nazývá vzorkování. Pík získaný z první kolony by se měl rozdělit na více frakcí (částí), které budou postupně dávkovány do druhé dimenze. Volba počtu frakcí na jeden pík je velmi důležitá, protože může dojít k tzv. podvzorkování. Znamená to, že se jednotlivé píky z první dimenze rozdělí na málo frakcí, čímž se ztrácí rozdělení látek z první dimenze. Volba správného vzorkovacího času souvisí se šířkou píku při základně, protože je potřeba pík z první dimenze rozdělit alespoň na tři frakce. Při volbě správného času přepnutí se předpokládá, že pík má ideální tvar Gaussovy křivky a jeho šířka při základně tedy odpovídá té teoretické, což se označuje jako 4σ . Hodnota 4σ znamená čtyřnásobek směrodatné odchylky a získá se jako vzdálenost dvou tečen na nulové linii, kdy tečny protínají inflexní body píku, které se nachází ve výšce dané součinem výšky píku s 0,607. Jak je důležitý správný čas vzorkování bude ukázáno na následujících třech příkladech [1, 2].

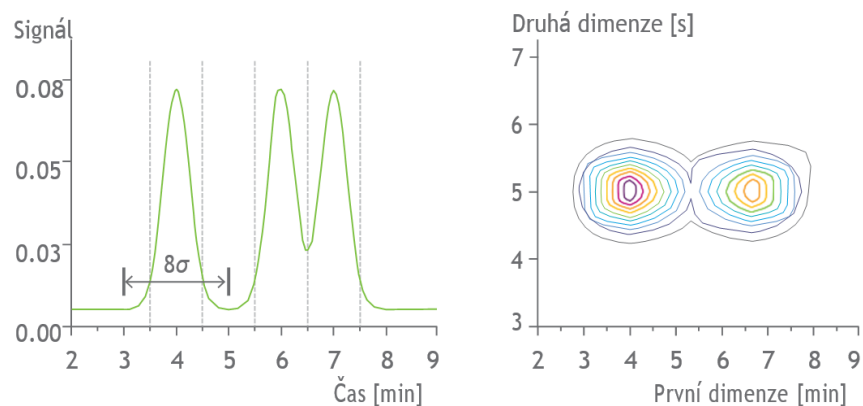
První příklad špatného nastavení času vzorkování je znázorněn na Obrázku 3. Separovaný vzorek obsahuje tři sloučeniny. Vzorkování eluátu z první dimenze je nastaveno na 2 minuty, což je dvojnásobek teoretické šířky píku při základně, tedy 8σ . V této separaci se úplně ztrácí rozdělení látek z první dimenze a ve výsledném

dvourozměrném chromatogramu budou všechny tři sloučeniny představovat jediný pík.



Obrázek 3: První příklad podvzorkování eluátu z první dimenze [2].

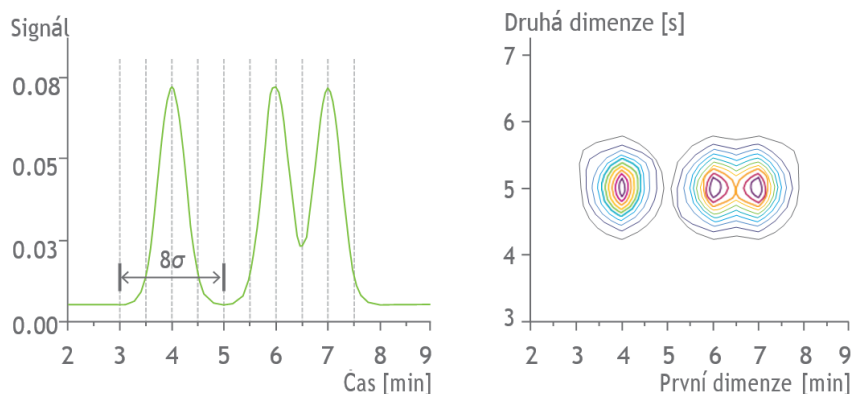
O trochu lepší nastavení času vzorkování pro separaci tří látek je vidět na Obrázku 4. Tady je čas odběru frakce nastaven na 1 minutu. Odebere se část eluátu, která odpovídá teoretické šířce píku při základně 4σ . To se ve výsledném 2D chromatogramu projeví tak, že jsou odděleny pouze dva píky místo tří.



Obrázek 4: Druhý příklad podvzorkování. Čas vzorkování je nastaven na 1 minutu, i když je to méně než dvojnásobná teoretická šířka 8σ , tak se sníží píková kapacita z první dimenze [2].

Nejllepší je nastavit čas vzorkování tak, aby teoretická dvojnásobná šířka píku při základně z první dimenze (8σ) byla rozdělena na tři až čtyři frakce (Obrázek 5). Ve výsledném chromatogramu budou vidět všechny tři oddělené látky ve formě skvrn. Čím se pík rozdělí na více frakcí, tím je lepší celkové rozlišení separace. Rozdělení eluátu z první dimenze na hodně frakcí přináší i nevýhody a to, že se získá velké množství frakcí, které je potřeba následně podrobit separaci na druhé

koloně, a tím se prodlouží celkový čas analýzy. Další nevýhodou rychlého vzorkování je, že se snižuje množství látek v jedné frakci a dochází tak k velkému naředění frakce mobilní fází při vymývání do druhé dimenze, čímž nastává problém s citlivostí detektoru [1, 2].



Obrázek 5: Ideální čas vzorkování, kdy se oddělí všechny tři látky [2].

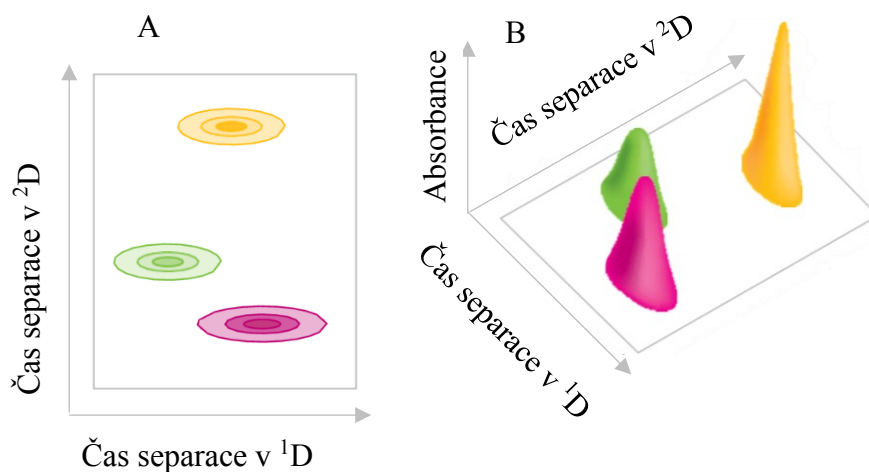
1.3 Detektory a vyhodnocení signálu ve 2D-LC

Detektor se zapojuje za kolonu ve druhé dimenzi a zaznamenává jednotlivé signály látek z každé separace. Podmínkou detektoru je, že musí snímat signály s vysokou skenovací frekvencí, minimálně 40 Hz. Jen díky tomu získáme dostatek bodů na vykreslení píku. Ideální je, aby detektor zaznamenal na vykreslení jednoho píku minimálně 7 bodů. Nejčastěji používanými detektory jsou detektor diodového pole [3, 4, 5], hmotnostní spektrometr [6], elektrochemický detektor [7], fluorescenční detektor [8], detektor rozptylu světla [9] a vodivostní detektor [10]. Fluorescenční detektor má nižší mez detekce než ostatní detektory a lze pozorovat i látky o koncentraci v pg/kg [1, 11].

Obtížnější zapojení dvourozměrné kapalinové chromatografie představuje hmotnostní spektrometr s elektrosprejovou ionizací [12, 13]. Problémem je vysoký průtok používaný ve druhé dimenzi (obvykle více než 2 ml/min), který zajišťuje rychlou separaci. Optimální průtok do iontového zdroje MS je do 1 ml/min. Proto se musí část mobilní fáze před vstupem do hmotnostního spektrometru odstranit, např. rozdělit, nebo se musí snížit průtok mobilní fáze ve druhé dimenzi (použití

užších kolon). Hmotnostní detektor se používá hlavně pro studium proteinů [2, 11], například i v lidské plazmě [14].

Vyhodnocení a konstrukce dvourozměrného chromatogramu probíhá pomocí speciálního softwaru, který data převede do konturového (2D chromatogram) neboli vrstevnicového grafu (Obrázek 6A). V něm jsou jednotlivé složky vzorku znázorněny ve formě skvrn. Obsah látky ve vzorku je v konturovém grafu znázorněn hustotou vrstevnicových čar v daném bodě. Osa X znázorňuje čas potřebný pro separaci v první dimenzi a osa Y znázorňuje čas separace pro druhou dimenzi. Software také umí zkonstruovat izometrický graf ve 3D zobrazení, kdy je na ose X vynesena čas separace pro první dimenzi, osa Y znázorňuje čas pro separaci ve druhé dimenzi a osa Z představuje odezvu detektoru, například absorbanci nebo četnost iontů (Obrázek 6B) [1].



Obrázek 6: Konturový dvoudimenzionální chromatogram (A) a izometrický chromatogram (B) dvourozměrné kapalinové chromatografie [2].

Kvantitativní vyhodnocení provádí software, který vytvoří z píků jedné látky obalovou křivku a vyhodnocení provede z její plochy. Zjištěná koncentrace není tak přesná jako u jednorozměrné kapalinové chromatografie, protože jeden pík je rozložen ve více frakcích. Rozdělení eluátu z první dimenze do více frakcí způsobí to, že koncentrace látky v jednotlivých frakcích bude nižší. V důsledku

toho se sníží odstup signálu od šumu a opakovatelnost separací. Horší korekce pozadí způsobí nižší přesnost určení správné koncentrace [1].

1.4 Terminologie dvourozměrné kapalinové chromatografie

S vývojem techniky se ustálila i terminologie, která se v současnosti standardně používá ve všech odborných textech. Seznam nejčastěji používaných zkratk a jejich význam je uveden v Tabulce 1 [2].

Tabulka 1: Seznam zkratk používaných ve dvourozměrné kapalinové chromatografii [2].

zkratka	význam
1D-LC	Jednorozměrná kapalinová chromatografie
2D-LC	Dvourozměrná kapalinová chromatografie
¹ D	První dimenze
² D	Druhá dimenze
LC×LC	„Comprehensive“ dvourozměrná kapalinová chromatografie
LC-LC	„Heart-cutting“ dvourozměrná kapalinová chromatografie
RP×RP	„Comprehensive“ dvourozměrná kapalinová chromatografie na reverzních fázích
mLC-LC	Vícenásobná „heart-cutting“ dvourozměrná kapalinová chromatografie
sLC×LC	Selektivní „comprehensive“ dvourozměrná kapalinová chromatografie

1.5 Druhy dvourozměrné kapalinové chromatografie

Existují dva typy dvourozměrné kapalinové chromatografie, a to:

- comprehensive (LC×LC) a
- heart-cutting (LC-LC).

„Comprehensive“ dvourozměrná kapalinová chromatografie (komplexní, úplná 2D-LC) plynule převádí všechny frakce z první dimenze přes rozhraní do kolony ve druhé dimenzi. Pro zachycení eluátu z první kolony se běžně používají dvě zachytávací smyčky nebo kolonky, které se pravidelně přepínají. Do jedné smyčky proudí eluát z první dimenze. Po otočení ventilu do druhé polohy se ze smyčky

vymývá frakce na druhou kolonu a zároveň se plní druhá smyčka eluátem z první dimenze. Výstupním záznamem je dvourozměrný chromatogram v podobě konturového grafu, který znázorňuje závislost doby separace ve druhé dimenzi na době separace v první dimenzi.

U typu „heart-cutting“ dvourozměrné kapalinové chromatografie (frakční 2D-LC) se do druhé dimenze převádí pouze některé vybrané frakce. Tento typ je vhodný pro vzorky s nižším počtem látek, které mají podobné retenční vlastnosti. Oproti „comprehensive“ dvourozměrné kapalinové chromatografii se snadněji optimalizuje a provozní náklady jsou nižší. Výsledným záznamem jsou jednotlivé chromatogramy, stejné jako při použití jednorozměrné kapalinové chromatografie [2, 15].

Dvourozměrná kapalinová chromatografie se rozděluje dále podle toho, jakým způsobem je zajištěno převedení frakcí, na [2]:

- online,
- offline a
- stop-and-go.

Online dvourozměrná kapalinová chromatografie automaticky převádí eluát z první dimenze na kolonu ve druhé dimenzi kontinuálně v reálném čase pomocí automaticky řízeného modulátoru, nejčastěji pomocí osmi- nebo deseticestného dvoupolohového ventilu se dvěma zachytávacími smyčkami nebo kolonkami. Čas přepnutí ventilu je dán časem, který je potřebný na separaci jedné frakce ve druhé dimenzi. Mobilní fáze v obou dimenzích musí být kompatibilní a mísitelné. Online dvourozměrná kapalinová chromatografie lze snadno automatizovat. Díky tomu jsou analýzy reprodukovatelné a rychlejší než v případě offline zapojení. Maximální rozlišovací schopnost je nižší než u offline metody, protože separace ve druhé dimenzi musí proběhnout rychle, řádově v desítkách sekund, ale maximálně v jednotkách minut [2, 16]. Z tohoto důvodu se do druhé dimenze zapojují spíše kratší kolony plněné monolitickou stacionární fází nebo povrchově porézními částicemi, aby byl zajištěn vysoký průtok mobilní fáze a tím rychlá separace. V první dimenzi se používají delší kolony s malým vnitřním průměrem, aby separace probíhala delší dobu a bylo možné rozdělit jeden pík minimálně do třech frakcí [1].

Na rozdíl od online konfigurace se u offline typu sbírají jednotlivé frakce z první dimenze do vialek. Po skončení separace v první dimenzi se jednotlivé frakce postupně dávkují do druhé dimenze. Výhodou u tohoto typu je to, že mobilní fáze používané v obou dimenzích nemusí být kompatibilní. Z frakcí lze před nadávkováním do druhé dimenze odstranit či vyměnit mobilní fázi, případně lze frakce a sloučeniny ve frakcích upravit jiným způsobem (zakoncentrování, derivatizace apod.). Další výhodou offline separace je to, že ve druhé dimenzi může probíhat separace delší dobu než u online dvourozměrné kapalinové chromatografie. Delší čas separace ve druhé dimenzi (jednotky až desítky minut) přináší vyšší rozlišení analyzovaných látek. Možné je také spojení s hmotnostním spektrometrem, protože ve druhé dimenzi lze použít nižší průtok mobilní fáze. Nevýhodou offline konfigurace je pracnost, mnohem delší časová náročnost než u online dvourozměrné kapalinové chromatografie. Při odběru, úpravě a následném dávkování jednotlivých frakcí může dojít k degradaci, ztrátě nebo jinému znehodnocení analytů. Separační systém nelze zautomatizovat, protože se nasbírané frakce ve vialkách musí do dávkovacího zařízení dávkovat ručně. Jelikož se s frakcemi pracuje manuálně, má offline metoda nízkou reprodukovatelnost [16, 17].

Třetí typ dvourozměrné kapalinové chromatografie, stop-and-go, využívá přerušovaný tok mobilní fáze v první dimenzi. Nejdříve dojde k naplnění jedné zachytávací smyčky a následně je zastaven průtok mobilní fáze v první dimenzi. Poté je obsah smyčky vymýván a separován na koloně ve druhé dimenzi. Následně se průtok mobilní fáze v první dimenzi obnoví a opět se smyčka plní eluátem z první kolony. Metoda nedosahuje takové účinnosti, protože dochází ke vzniku podélné difuze v koloně při zastavení toku mobilní fáze a rozšiřování elučních zón, v důsledku toho se snižuje píková kapacita v první dimenzi [2, 3].

1.6 Výběr a ortogonalita separačních systémů

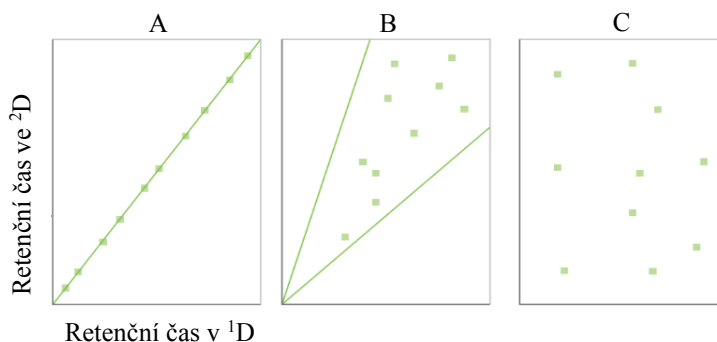
Výběr separačních systémů pro dvourozměrnou kapalinovou chromatografii je velmi důležitý, protože při spojení špatných separačních systémů nedochází k plnému využití potenciálu dvourozměrných metod a nárůst píkové kapacity celého systému oproti jednorozměrné separaci je velmi malý.

Separací systémy, které nelze propojit, mají často nekompatibilní mobilní fáze nebo dochází k velkému naředění vzorku dávkovaného na druhou kolonu. Dochází tím k rozmývání píků a často je problém i s citlivostí detekce. Špatné kombinace separačních systémů se vyznačují i nízkou ortogonalitou a vysokou korelací [1, 18].

Dvojice separačních systémů musí být tedy ortogonální. To znamená, že separace v obou kolonách musí probíhat na základě odlišných vlastností, například náboj molekuly, velikost sloučeniny, hydrofilita nebo vazebná schopnost k silanovým skupinám na stacionární fázi. S ortogonalitou se pojí i pojem korelace, který určuje, jak hodně je rozdílný mechanismus separace v první a ve druhé dimenzi [2, 16]. Aby separace složitých vzorků byla co nejlepší, musí se při navrhování metody analýzy vybrat takové kolony, které mají vysokou ortogonalitu, ale co nejnižší korelaci. Čím jsou separační mechanismy podobnější, tím roste korelace a snižuje se ortogonalita celého systému [1].

Podle ortogonalit se separační systémy rozdělují na [2]:

- systémy s nízkou ortogonalitou (Obrázek 7A),
- systémy s částečnou ortogonalitou (Obrázek 7B) a
- systémy s vysokou ortogonalitou (Obrázek 7C).



Obrázek 7: Ukázky systémů ortogonalit: A) systém s nízkou ortogonalitou – pro analýzu vzorku nevhodné, B) systém s částečnou ortogonalitou – získá se při reálné separaci, C) systém s vysokou ortogonalitou – ideální separace, ale v praxi často nedosažitelná [2].




V systémech s nízkou ortogonalitou a vysokou korelací se rozseparované látky ve 2D chromatogramu nachází pouze na diagonále a nejsou rozmístěny po celém chromatogramu, jak ukazuje Obrázek 7A. Příčinou nízké ortogonalitativy systému je, že látky v první i ve druhé dimenzi mají téměř totožné pořadí retence (respektive retenční časy), anebo obě kolony rozdělují analyty na základě stejné vlastnosti.

Naproti tomu systémy s vysokou ortogonalitou (Obrázek 7C) a nízkou korelací mají jednotlivé píky rovnoměrně rozloženy po celé ploše 2D chromatogramu. Rozdílné retenční časy jednotlivých látek na kolonách v první i ve druhé dimenzi mají lepší rozložení píků a tím je větší pravděpodobnost, že se látky v komplexním vzorku rozdělí. Pro získání tohoto záznamu je nutné, aby každá dimenze separovala látky na základě rozdílné vlastnosti a zároveň musí mít látky ve vzorku alespoň dvě tyto vlastnosti, například proteiny mají tři rozdílné vlastnosti: hydrofobnost, velikost molekul a náboj. Systémy s vysokou ortogonalitou jsou spíše teoretické a v praxi obtížně proveditelné [1, 2, 11].

Při reálné separaci se musí při navrhování separačního systému brát ohled na vlastnosti separovaných sloučenin. V důsledku toho se často volí separační systémy, které mezi sebou částečně korelují, a proto nedosahují vysoké ortogonalitativy separačního systému, ale pouze ortogonalitativy částečné (Obrázek 7B) [16].

Výběr vhodných separačních systémů usnadní Tabulka 3, ve které jsou uvedeny všechny kombinace separačních systémů. Složitost zapojení je rozlišena barvou – zelené se snadno propojí, červené se obtížně zapojují. V Tabulce 3 jsou zhodnoceny kombinace separačních systémů i podle ortogonalitativy, píkové kapacity, času přípravy kolon pro další analýzu a kompatibility mobilních fází. V Tabulce 2 jsou uvedeny vysvětlivky použité v Tabulce 3 [18].

Tabulka 2: Význam jednotlivých symbolů použitých v Tabulce 3 [18].

Symbol	Význam	Použití pro	Poznámka
A	Absorpce	² D	V důsledku injekčního rozpouštědla se prodlužuje eluční doba. Platí pro SEC.
B	Průlom/zkreslení píků	LC×LC	Včasná eluce analytů dávkovaných do druhé dimenze.
E	Snadná modulace	LC×LC	Snadný vývoj systémů s aktivní modulací.
F	Rychlá separace	² D	Krátký čas separace (pod 1 min).
H	Vysoké rozlišení	¹ D, ² D	Metoda s vysokou píkovou kapacitou.
I	Izokratická eluce	¹ D, ² D	Možnost izokratické separace, zjednodušení nastavení.
M	Kompatibilní s MS	² D	Přídavek těkavých aditiv do mobilní fáze a možnost spojení s MS.
O	Ortogonální	LC×LC	Udává stupeň nezávislosti dvou separačních systémů, za předpokladu, že směs analytů má stejné vlastnosti, na které je zaměřena separace.
P	Použitelnost	LC×LC	Užitek z výsledného rozseparování.
Q	Reekvilibrace kolony	² D	Rychlost reekvilibrace kolony.
	Doporučeno otočit pořadí módu	LC×LC	Doporučení obrátit pořadí separačních mechanismů.
S	Selektivní/specifické	¹ D, ² D	Schopnost separační metody rozdělit složky na základě chemické vlastnosti (např. polarita, složení/sekvence).
X	Kompatibilní rozpouštědla	LC×LC	Rozsah kompatibility frakce z první dimenze a eluentu ve druhé dimenzi.
	Polymery		Vhodné/nevhodné pro separaci polymerů.
	Proteiny		Vhodné/nevhodné pro separaci proteinů.

Tabulka 3: Možné kombinace separačních systémů. Sloupce představuje separační módy v první dimenzi, separační systémy pro druhou dimenzi jsou uvedeny v horním řádku. Vyznam zkratk separačních systémů: RP – systém s reverzní fází; NP – systém s normální fází; HILIC – chromatografie hydrofilních interakcí; HIC – chromatografie hydrofobní interakce; IEX – iontové výměnná chromatografie; SEC-Aq – chromatografie sterické vyluky s vodnou mobilní fází; SEC-Or – chromatografie sterické vyluky s organickou mobilní fází; Ag – argentická chromatografie; Chiral – chirální chromatografie; Affinity – afinitní chromatografie; SFC – superkritická fluidní chromatografie [18].

	2 RP F ⁺ H ⁺ Q ⁺ M ⁺	2 NP F ⁻ Q ⁻	2 HILIC M ⁺ Q ⁻	2 HIC F ⁻ H ⁻ M ⁻ Q ⁻	2 IEX M ⁻ Q ⁻ S ⁺	2 SEC-Aq F ⁺ H ⁺ I ⁺	2 SEC-Or F ⁺ H ⁺ I ⁺	2 Ag F ⁻ Q ⁻ S ⁺	2 Chiral F ⁺ I ⁺ S ⁺	2 Affinity H ⁻ Q ⁻ S ⁺	2 SFC F ⁺ H ⁺ M ⁺
1 RP H ⁺ S ⁺	E ⁰⁺ p ⁺ X ⁺	B ⁰ 2 ⁺ X ²⁻	B ⁰ 2 ⁺ X ⁺	B ⁰ E ⁻ p ⁻ X ⁺	O ⁺	A ⁰ E ⁰⁺ p ⁺ X ⁺	A ⁰ E ⁰⁺	B ⁰ 2 ⁺ X ⁻	O ²⁺	O ²⁺ X ⁺	B ⁰ 2 ⁺ X ⁻
1 NP H ⁺	B ⁰ 2 ⁺ X ²⁻	O ⁻ p ⁻ X ⁺	O ⁻ p ⁻ X ⁻	B ⁰ 2 ⁺ p ⁻ X ²⁻	O ²⁺	O ²⁺ X ²⁻	O ²⁺ p ⁺ X ⁺	O ⁺ X ⁺	O ²⁺	O ⁺ X ²⁻	O ⁻ X ²⁺
1 HILIC H ⁺	B ⁰ 2 ⁺ p ⁺ X ⁺	B ⁰ X ⁻	O ⁻ X ⁺	B ⁰ 2 ⁺ p ⁻ X ⁻	O ⁺ X ⁺	O ²⁺ p ⁺	A ⁰ X ⁺	B ⁰ X ⁻	O ²⁺	X ⁻	X ⁺
1 HIC H ⁺	E ⁰ X ²⁺	B ⁰ 2 ⁺ p ⁻ X ²⁻	B ⁰ 2 ⁺ X ⁻	O ²⁻ p ²⁻	B ⁰ X ⁻	O ²⁺ p ⁻ X ²⁺	A ⁰ X ⁺	B ⁰ 2 ⁺ p ⁻ X ²⁻	O ²⁺ p ²⁻	O ⁺ X ⁺	O ⁺ p ²⁻ X ²⁻
1 IEX H ⁺ S ⁺	E ⁰ p ⁺ X ²⁺	B ⁰ 2 ⁺ X ²⁻	B ⁰ X ⁻	B ⁰ X ⁻ X ²⁺	B ⁰ X ⁻	O ⁺ X ²⁺	A ⁰ X ⁺	B ⁰ X ⁻	O ²⁺	O ⁺ X ⁺	O ⁺ X ²⁻
1 SEC-Aq H ⁺	E ⁰ p ⁺ X ²⁺	B ⁰ 2 ⁺ X ²⁻	B ⁰ 2 ⁺ X ⁻	B ⁰ X ⁻	O ⁺ X ²⁺	O ²⁻ p ²⁻	A ⁰ 2 ⁺ p ²⁻ X ²⁻	O ²⁻ X ²⁻	O ²⁺ p ⁻	O ²⁺ X ⁺	E ⁰ 2 ⁺ p ⁻ X ⁻
1 SEC-Or H ⁺	B ²⁻ O ⁻ X ⁻	B ⁰ 2 ⁺ X ⁺	O ⁺ X ⁺	B ⁰ X ⁻ X ²⁻	B ⁰ X ⁻	O ²⁻ p ²⁻ X ⁻	O ²⁻ p ²⁻	O ²⁺ X ⁺	O ²⁻ p ⁻	O ²⁺ p ²⁻ X ⁻	O ⁺ p ⁻ X ⁺
1 Ag H ⁺ S ⁺	B ⁰ 2 ⁺	O ⁺ X ⁺	O ⁺ X ⁺	B ⁰ 2 ⁺ p ⁻ X ⁻	O ²⁺ X ⁻	O ²⁺ X ⁻	O ²⁺ X ⁻	O ²⁻ p ²⁻	O ²⁺	O ²⁺ X ²⁻	O ⁺ X ⁺
1 Chiral I ⁺ S ⁺	O ²⁺	O ²⁺	O ²⁺	O ²⁺ p ²⁻	O ²⁺	O ²⁺ p ⁻	O ²⁺ p ⁻	O ²⁺	O ²⁻ p ²⁻	O ²⁺	O ²⁺
1 Affinity H ⁺ S ⁺	O ²⁺ p ⁻ X ⁺	B ⁰ 2 ⁺ p ⁻ X ⁻	B ⁰ 2 ⁺ p ⁻	O ²⁺ p ⁻	O ⁺ p ⁻ X ⁺	O ²⁺ p ⁻ X ⁺	A ⁰ 2 ⁺ p ²⁻ X ²⁻	B ⁰ 2 ⁺ p ⁻ X ⁻	O ²⁺ p ⁻	O ⁻ p ²⁻	O ⁺ p ⁻ X ²⁻
1 SFC H ⁺	E ⁰ 2 ⁺ X ⁺	O ⁻ X ⁺	E ⁰	O ²⁺ p ³⁻	O ²⁺ X ⁺	O ²⁺ p ²⁻ X ²⁺	O ²⁺ X ²⁺	O ⁺ X ⁺	O ²⁺	O ²⁺ X ⁻	E ⁰ X ²⁺

1.6.1 Reverzní fáze (RP)

Separace analytů na reverzní fázi probíhá na základě jejich odlišné hydrofóbnosti. Analyty interagují se stacionární fází svou nepolární částí, protože stacionární fáze je nepolární a mobilní fáze je polární. Používají se chemicky modifikované stacionární fáze na bázi silikagelu, nejčastěji modifikované alkyly (např. oktyl-silikagel, oktadecyl-silikagel). Systém umožňuje rychlou a účinnou separaci. Zlepšit účinnost separace je možné pomocí gradientové eluce mobilní fáze anebo zvýšením teploty na koloně [11].

Ve dvourozměrné kapalinové chromatografii lze využít reverzní fáze do obou dimenzí, nicméně obě stacionární fáze musí poskytovat odlišnou retenci analytů. Například se kombinují oktadecyl-silikagelová stacionární fáze pro první dimenzi a pro druhou dimenzi polyethylenglykolová, zirkoniová, aminová stacionární fáze nebo kolona plněná porézním grafitovým uhlíkem. Dvourozměrný separační systém složený ze dvou reverzních fází se vyznačuje vyšší korelací. Na druhou stranu není nutné se potýkat s kompatibilitou mobilních fází a celý systém je snáze optimalizovatelný. Zvýšit ortogonalitu je možné použitím gradientu, změnou pH v jedné mobilní fázi nebo přidavkem iont-párového činidla do mobilní fáze [1, 4, 11, 19].

Propojení normální fáze (NP) v první dimenzi s reverzní fází ve druhé dimenzi není jednoduché, protože obě mobilní fáze nejsou kompatibilní. Pro odstranění nekompatibility systémů se často používají aktivní modulátory (budou popsány v kapitole 1.8). Kombinace NP×RP se vyznačuje vysokou ortogonalitou a poskytuje separace s vysokým rozlišením [20, 21].

Kolona s reverzní fází zapojená v první dimenzi lze propojit s kolonou pro chromatografii sterické vyluky (RP×SEC). Tento separační systém se používá pro separaci polymerů. Separační systémy lze i obrátit, tedy reverzní fáze se zapojí do druhé dimenze (SEC×RP). Propojení těchto módů má ale horší kompatibilitu mobilních fází a často se pro separace nevyužívá [6, 19].

Kolonu s reverzní fází je možné spojit s iontově výměnnou chromatografií. V první dimenzi se analyty separují na základě hydrofóbnosti a ve druhé dimenzi na základě iontových vlastností. Spojení obou separačních systémů se používá

v biologických a farmaceutických aplikacích [11, 22]. Separační módy lze zapojit i v opačném pořadí, tedy v první dimenzi bude iontově výměnná chromatografie a ve druhé dimenzi se použije reverzní fáze. Tato kombinace se často využívá v proteomice k separaci proteinů a peptidů [1, 12].

1.6.2 Chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC)

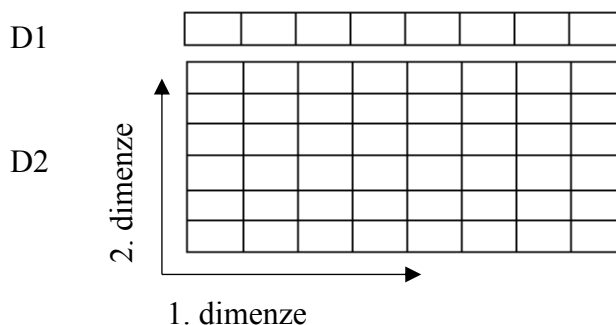
Separační systém vychází z kombinace normální a reverzní fáze. Z normální fáze chromatografie hydrofilních interakcí převzala polární stacionární fázi (např. silikagel, diol). Ze systému reverzní fáze HILIC využívá mobilní fázi, která se skládá z vodné a organické složky, přičemž organická složka převažuje. Na polární stacionární fázi se přednostně sorbuje voda a vytváří tak pseudostacionární fázi. Analyty se dělí podle hydrofilnosti, tedy jak silně interagují s vodnou vrstvou na stacionární fázi.

Protože chromatografie hydrofilních interakcí vychází z reverzní fáze, tak se právě často s reverzní fází kombinuje. Mobilní fáze obou separačních systémů jsou kompatibilní. Dvoudimenzionální kapalinová chromatografie složená z těchto separačních módů se používá pro separaci polárních látek [1, 11], např. fosfolipidů [23] a antioxidantů [24].

1.7 Účinnost separace

Stejně jako u jednorozměrné vysokoúčinné kapalinové chromatografie tak i u dvourozměrné kapalinové chromatografie se jako parametr účinnosti separace používá píková kapacita. Celková píková kapacita dvourozměrné separace je v ideálním případě dána součinem píkových kapacit v obou dimenzích, jak znázorňuje Obrázek 8. Nárůst píkové kapacity oproti jednorozměrné kapalinové chromatografii je tedy výrazný. Nicméně při reálné separaci se této maximální teoretické píkové kapacity nedosahuje. Píková kapacita je závislá na mnoha separačních podmínkách v obou dimenzích, například průtoku mobilní fáze, teplotě kolony, eluční síle mobilní fáze, času gradientu rozpouštědla a podobně [1, 11, 16]. Sloučeniny také mohou koeluovat, proto se získá nižší počet rozseparovaných látek.

Mezi další důvody, proč se nedosahuje teoretické kapacity, se řadí: podvzorkování eluátu z první dimenze, korelace separačních systémů a špatná kompatibilita mobilních fází používaných v obou dimenzích [1].



Obrázek 8: Znárodnění pikové kapacity pro jednorozměrnou (D1) a dvourozměrnou (D2) kapalinovou chromatografii.

Pro dosažení co největší pikové kapacity je nutné splnit určité podmínky [1]:

- rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti, podle kterých se látky rozdělují v první a ve druhé dimenzi,
- vzorek, celý nebo jeho vybraná část, musí projít celým separačním systémem, tedy první i druhou kolonou,
- separace látek dosažená první dimenzí nesmí být ztracena při převodu do druhé dimenze, například vlivem špatného vzorkování a
- využití gradientů mobilních fází v obou dimenzích místo izokratické eluce.

1.8 Modulátory

Jak již bylo uvedeno v kapitole 1.2, pro převod frakcí eluátu z první do druhé dimenze v online zapojení je potřeba rozhraní, které se obecně nazývá modulátor. Je to velmi důležitá část instrumentace, protože ovlivňuje celkový výkon 2D systému [2].

Modulátory se dělí do dvou kategorií [25]:

- pasivní modulátory a
- aktivní modulátory.

Mezi pasivní modulátory se řadí multiportové dvoupolohové ventily se dvěma zachytávacími smyčkami nebo kolonkami a ventil, který propojuje první dimenzi

se dvěma nebo i více paralelními kolonami ve druhé dimenzi. Separáční systémy propojené těmito pasivními modulátory vyžadují kompatibilní mobilní fáze, jinak dochází k deformacím a rozmývání píků ve druhé dimenzi [25]. Pasivní modulátory nejsou schopny odstranit nekompatibilitu mobilních fází, kdy mobilní fáze z první dimenze má větší eluční sílu, než je počáteční eluční síla druhé mobilní fáze. Další nevýhodou použití pasivní modulace je v tom, že frakce je při vymývání mobilní fází naředěna. Tak se na druhou dimenzi dávkuje velký objem frakce, což způsobí rozmytí píků a zároveň to přináší problém s detekcí [4].

Zmíněné nevýhody nelze často snadno překonat, a proto se začaly vyvíjet aktivní modulátory. Ty umožnují výměnu nebo naředění mobilní fáze z první dimenze nebo i zakoncentrování analytu před separací ve druhé dimenzi. Mezi aktivní modulátory se řadí: pasivní modulace rozpouštědlem (FSM), aktivní modulace rozpouštědlem (ASM), pulzní eluční modulace (PE), modulátor s vakuovým odpařováním (VEI), rozhraní s odpařovací membránou (EMM), tepelná modulace (TM), podélná on-column tepelná modulace (LOCTM), modulace zachytáváním za studena (CT), asistovaná modulace stacionární fází (SPAM), modulace ředěním na koloně (ACD) [25].

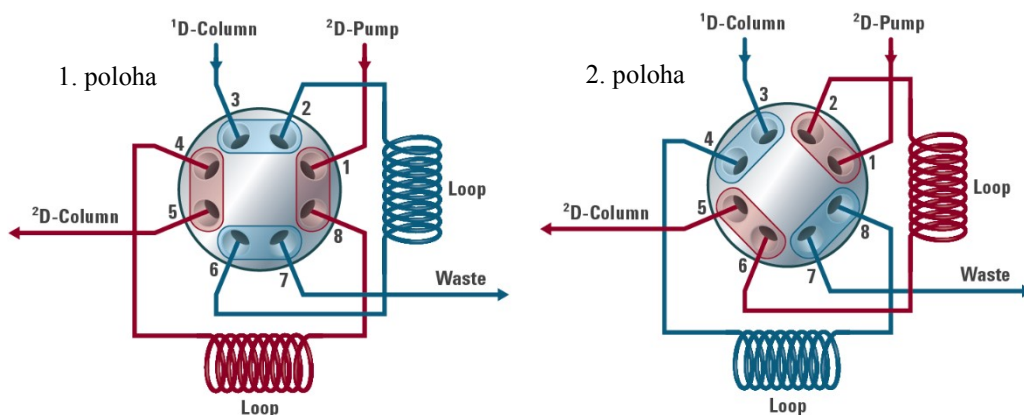
Ve většině druhů modulátorů se využívají zachytávácí smyčky nebo kolonky. Potřebný objem vzorkovacích smyček pro správné vzorkování se vypočítá ze součinu přutoku v první dimenzi, F_{m1} , a času, t , po který se eluát z první dimenze vzorkuje (Rovnice 2).

$$V_{inj} = F_{m1} \times t \quad (2)$$

Pokud se zvolí objem smyčky přesně podle výpočtu, může to věst k tomu, že část eluátu odejde do odpadu. Proto se objem smyček volí o 30 % větší než vypočítáný objem podle Rovnice 2. Objemy obou zachytávácích smyček nebo kolonek musí být stejné, aby byl zachován stejný objem mobilní fáze potřebný pro vymytí eluátu na kolonu [2].

1.8.1 Nejstarší typy modulátorů

Nejstarším používaným modulátorem je elektronicky řízený osmicestný dvoupolohový ventil se dvěma zachytávacími smyčkami (Obrázek 9). Ventil, stejně jako u jednorozměrné kapalinové chromatografie, musí být odolný vůči vysokému tlaku, který je potřebný hlavně ve druhé dimenzi pro rychlou separaci [1, 2].

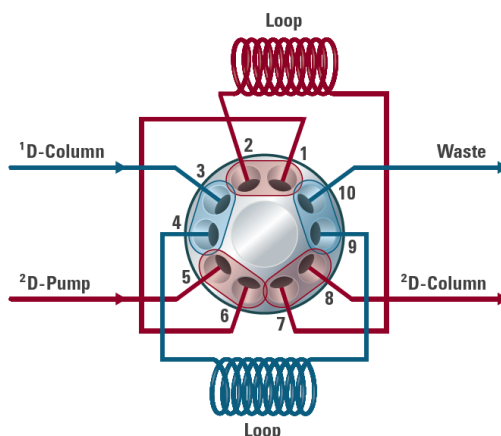


Obrázek 9: Osmicestný dvoupolohový ventil se dvěma zachytávacími smyčkami a jeho dvě pozice [2].

Princip fungování osmicestného dvoupolohového ventilu spočívá v plnění jedné smyčky eluátem z první dimenze (Obrázek 9 – 1. poloha). Po přepnutí ventilu do druhé pozice se smyčka vymývá mobilní fází na druhou kolonu a zároveň je druhá smyčka plněna eluátem z první dimenze (Obrázek 9 – 2. poloha). Ventil se pravidelně cyklicky přepíná z jedné polohy do druhé během celé separace. Z principu vyplývá, že separace ve druhé dimenzi musí proběhnout dříve nebo maximálně stejně rychle, jako je čas plnění smyčky [1, 18].

Jedna smyčka u osmicestného dvoupolohového ventilu se proplachuje mobilní fází na druhou kolonu po směru plnění eluátem, ale druhá smyčka je vymývána na kolonu v opačném toku, než byla naplněna. Rozdílnost ve vymývání s sebou přináší rozdílnou šířku píků a rozdílný retenční čas stejné látky ve dvou sousedních frakcích na druhé koloně [2].

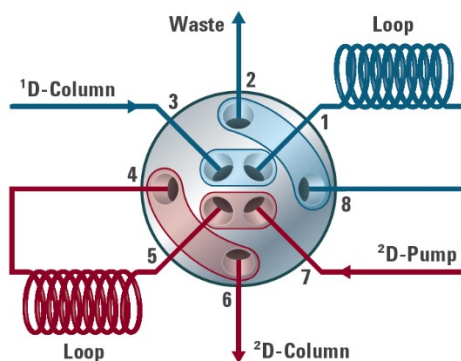
Posuny retenčního času lze odstranit při zapojení deseticestného dvoupolohového ventilu se dvěma zachytávacími smyčkami (Obrázek 10) nebo kolonkami. Princip plnění a vymývání smyček u deseticestného ventilu je stejný jako u osmičestného dvoupolohového ventilu [1].



Obrázek 10: Nákres deseticestného dvoupolohového ventilu se dvěma zachytávacími smyčkami [2].

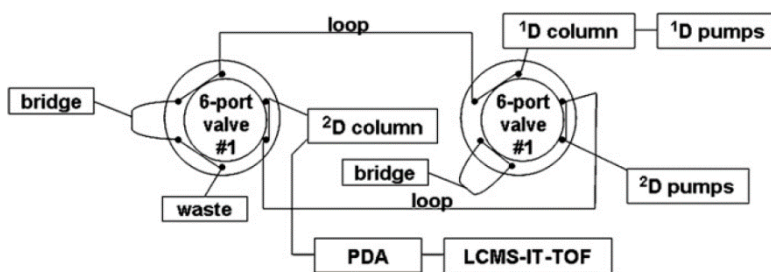
Deseticestný dvoupolohový ventil má výhodu v oboustranném vymývání smyček mobilní fázi, a to jak po směru plnění, tak i v protisměru plnění eluátem [19]. Nevýhodou jeho konstrukce je spojka, která slouží k propojení dvou portů ventilu (na Obrázku 10 propojuje porty 1 a 6), aby mohlo dojít k současnému vzorkování eluátu a vymývání frakce na druhou kolonu. V poloze 1 je spojka umístěna před první smyčkou (Obrázek 10, červená smyčka). Při otočení do druhé polohy a vymývání druhé smyčky (Obrázek 10, modrá smyčka) se spojka nachází až za touto smyčkou. Rozdílné umístění spojky způsobuje malý posun retenčního času ve druhé dimenzi v závislosti na tom, z jaké smyčky pochází daná frakce [1, 2].

S inovací vzorkovacích ventilů přišla firma Agilent Technologies, která vyvinula ideální modulátor, který nazvala duo čtyřportový dvoupolohový ventil (Obrázek 11). Tento ventil umožňuje symetrické plnění i vymývání obou smyček, protože ventil má speciální rotor se dvěma koncentrickými kružnicemi, na kterých jsou umístěny vždy 4 porty. Ventil nepotřebuje pomocnou kapiláru jako deseticestný ventil a zároveň umožňuje plnění a vymývání obou smyček jak ve stejném směru, tak i v protisměru [1, 2].



Obrázek 11: Duo čtyřcestný dvoupolohový ventil se dvěma zachytávacími smyčkami [2].

Když nejsou k dispozici předešlé základní tři typy dvoupolohových ventilů, používají se i různé kombinace dalších dvoupolohových ventilů. Snadno dostupný je šesticestný dvoupolohový ventil, který se běžně využívá pro dávkování vzorků v jednorozměrné kapalinové chromatografii. V „comprehensive“ dvourozměrné kapalinové chromatografii se musí zapojit dva dvoupolohové šesticestné ventily se dvěma zachytávacími smyčkami (Obrázek 12), protože je potřeba propojit celkem 7 pozic. Ventily propojují přítok z první dimenze, první zachytávací smyčku, odpad, druhou zachytávací smyčku, přítok mobilní fáze pro druhou dimenzi a odtok na kolonu ve druhé dimenzi.



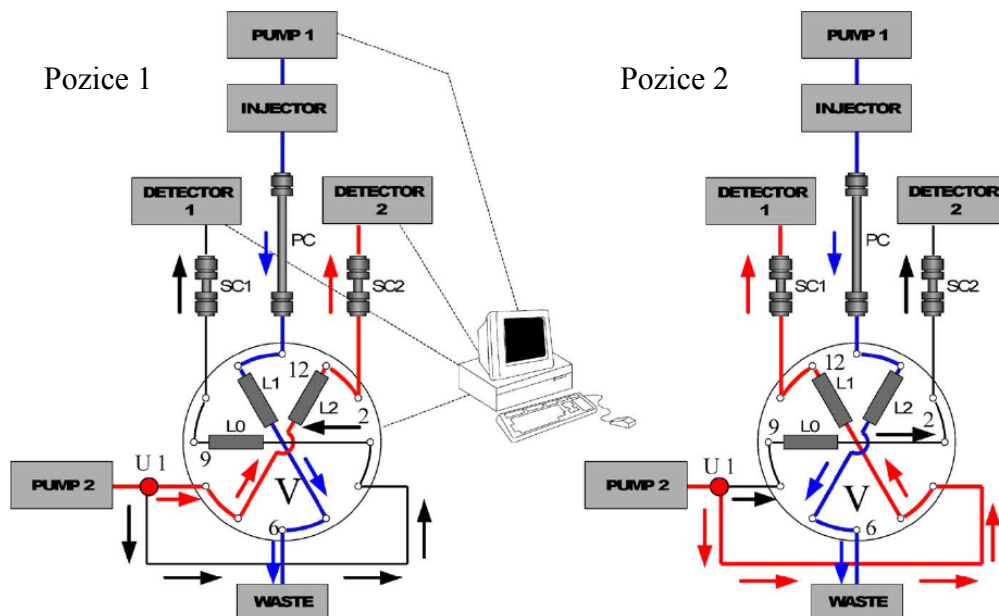
Obrázek 12: Dva šesticestné dvoupolohové ventily se dvěma zachytávacími smyčkami [26].

Nevýhodou použití šesticestných ventilů bývá náročná synchronizace přepínání obou ventilů. Druhou nevýhodou je připojení pomocných kapilár na obou ventilech (na Obrázku 12 označené „bridge“). Pomocná kapilára se nachází při vymývání smyčky v pozici 1 před touto smyčkou, kdežto v pozici ventilu 2 se pomocná kapilára nachází až za vymývanou smyčkou. Výhodou konstrukce může být možnost proplachovat zachytávací smyčky po směru i v protisměru plnění smyčky. Možnost oboustranného proplachování je patrná hlavně při zapojení

zachytávacích kolonek místo smyček, protože analyty můžeme v zachytávacích kolonkách zakoncentrovat. Eluát z první dimenze se zachytí na začátku kolonky a frakce je při vypláchnutí v opačném směru dávkována na kolonu v úzké zóně [19]. Dva šesticestné dvoupolohové ventily se dvěma zachytávacími smyčkami se mohou použít pro zapojení dvou paralelních kolon ve druhé dimenzi [27].

1.8.2 Paralelní kolony ve druhé dimenzi

Separace na 2D-LC chromatografu většinou trvá dlouho, proto je snaha separace zrychlit a zároveň zachovat píkovou kapacitu v obou dimenzích. Zrychlení analýz umožňuje zapojení dvou nebo i více kolon ve druhé dimenzi, na kterých současně probíhá separace. Touto složitou konstrukcí se dosáhne toho, že se může prodloužit čas separace ve druhé dimenzi, zvýší se píková kapacita a dosáhne se lepší separace všech látek. Zapojení dvou kolon ve druhé dimenzi umožňuje dvanácticestný dvoupolohový ventil se dvěma zachytávacími smyčkami a jednou pomocnou smyčkou (Obrázek 13).



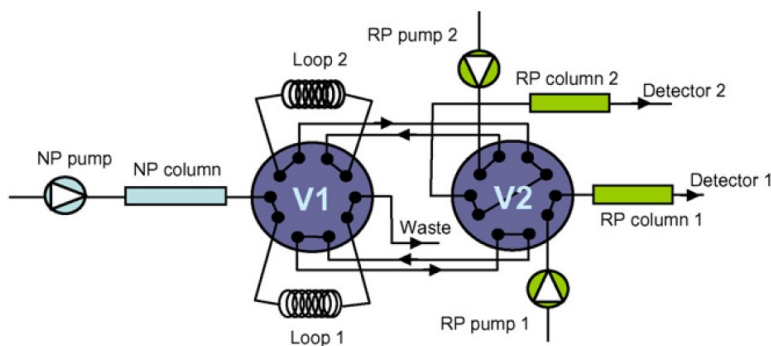
Obrázek 13: Dvoupolohový dvanácticestný ventil se třemi smyčkami (L0, L1, L2) a dvěma kolonami ve druhé dimenzi (SC1 a SC2) [20].

Dvě smyčky ve dvoupolohovém dvanácticestném ventilu (na Obrázku 13 smyčky L1 a L2) slouží pro zachycení eluátu z první dimenze. Třetí smyčka se

využívá pro udržení konstantního průtoku mobilní fáze pro obě kolony. Objem všech tří smyček musí být stejný, aby byl zajištěn konstantní průtok ve druhé dimenzi.

Princip fungování dvoupolohového dvanácticestného ventilu je podobný jako u výše představených modulátorů. První smyčka (L1) se plní eluátem z první dimenze (Obrázek 13 – Pozice 1). Po přepnutí ventilu do druhé pozice (Obrázek 13 – Pozice 2) je frakce ze smyčky vymývána mobilní fází na jednu z kolon ve druhé dimenzi (SC1). Rozdíl fungování nastává v tom, že tok mobilní fáze se před vstupem do zachytávací smyčky rozděluje na dva toky v děliči toku (na Obrázku 13 znázorněno U1). Část mobilní fáze prochází smyčkou a vymývá analyty na kolonu (SC1) ve druhé dimenzi. Druhá část mobilní fáze protéká třetí smyčkou (L0) na kolonu (SC2) ve druhé dimenzi, kde již probíhá separace. Dvanácticestný dvoupolohový ventil není tak rozšířen jako duo čtyřcestný dvoupolohový ventil, ale našel uplatnění pro speciální separace aromatických látek a aminů [19, 20].

Zapojení dvou i více kolon ve druhé dimenzi neumožňuje pouze dvanácticestný dvoupolohový ventil, ale lze použít i dva deseticestné dvoupolohové ventily se dvěma zachytávacími smyčkami. Schéma propojení dvou deseticestných dvoupolohových ventilů se dvěma zachytávacími kolonkami a dvěma paralelními kolonami ve druhé dimenzi je znázorněn na Obrázku 14.



Obrázek 14: Schéma dvou deseticestných ventilů se dvěma zachytávacími smyčkami a dvěma kolonami ve druhé dimenzi [28].

První (V1) deseticestný ventil se dvěma zachytávacími smyčkami funguje stejně, jak již bylo popsáno výše. Druhý deseticestný ventil (V2) se zařazuje proto,

aby zároveň mohlo probíhat plnění smyčky eluátem, regenerace první kolony ve druhé dimenzi a separace na druhé koloně ve druhé dimenzi [28].

Nevýhodou zapojení více kolon ve druhé dimenzi je složitá instrumentace, použití více čerpadel mobilní fáze pro druhou dimenzi a každá kolona musí mít svůj detektor. U detektorů se může stát, že každý bude mít trochu odlišnou odezvu signálu. Výhodou je vyšší rozlišení, vyšší píková kapacita separačního systému a kratší doba separace [19, 28]. Zrychlení separace nastává, pokud doba separace na všech kolonách druhé dimenze bude stejná a ve druhé dimenzi se použijí stejné kolony se stejnými stacionárními fázemi, tak může separace na kolonách probíhat současně. Získat dvě naprosto stejné kolony je však problematické, protože i u komerčně dostupných kolon existuje jistá variabilita vlivem výroby [28].

Stacionární fáze v obou kolonách ve druhé dimenzi nemusí být stejné, ale mohou být rozdílné [27]. Jistou nevýhodou je obtížná realizace, kdy nastává problém v kompatibilitě mobilních fází, protože pro každou kolonu ve druhé dimenzi se může použít mobilní fáze o jiném složení [18]. Kombinace dvou odlišných kolon ve druhé dimenzi a s detektorem pro každou kolonu s sebou přináší delší čas analýzy, protože pro získání celých chromatogramů je potřeba provést více analýz. Například pokud se pro separaci se ve druhé dimenzi použijí dvě odlišné kolony, jedna s oktadecyl-silikagelovou stacionární fází a druhá s vázaným fluorovaným alkylem na silikagelu, je potřeba pro získání komplexního 2D chromatogramu provést dvě analýzy. V první separaci se první odebraná frakce z první dimenze rozděluje na koloně s oktadecyl-silikagelovou stacionární fází. Při druhé separaci probíhá rozdělení látek z první frakce nejprve na koloně s fluorovaným alkylem na silikagelu. Takto se získají dva chromatogramy, které poskytnou více informací o dělených látkách, než když se použije jedna kolona ve druhé dimenzi [27].

Využití dvou i více paralelních kolon [29] ve druhé dimenzi se uplatňuje hlavně v biologických aplikacích pro rozdělení směsi proteinů [27].

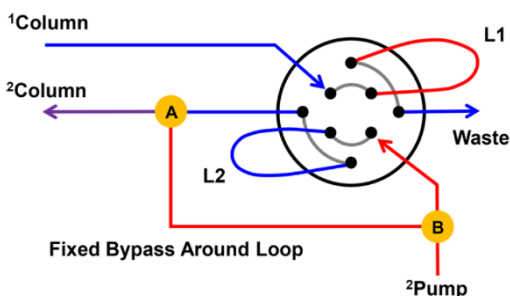
1.8.3 Modulace rozpouštědlem

Potenciál výrazného navýšení píkové kapacity a účinnosti 2D separace snižuje z velké míry nekompatibilita mobilních fází. Z tohoto důvodu se začaly vyvíjet

metody, jak nekompatibilitu potlačit. Jednou z navrhovaných možností je aktivní modulace. Aktivní modulace umožňuje naředit nebo i dokonce vyměnit mobilní fázi z první dimenze, a tím se separační systémy navzájem neovlivňují.

1.8.3.1 Pasivní modulace rozpouštědlem

První se začala rozvíjet pasivní modulace rozpouštědlem (FSM – Fixed Solvent Modulation), která využívá dvoupolohový deseticestný nebo osmicestný ventil se dvěma zachytávacími smyčkami a „bypass“ kapiláru (přemostění), která má pevnou pozici (Obrázek 15).



Obrázek 15: Pasivní modulace rozpouštědlem – duo čtyřcestný dvoupolohový ventil se dvěma zachytávacími smyčkami a pevným „bypassem“ [5].

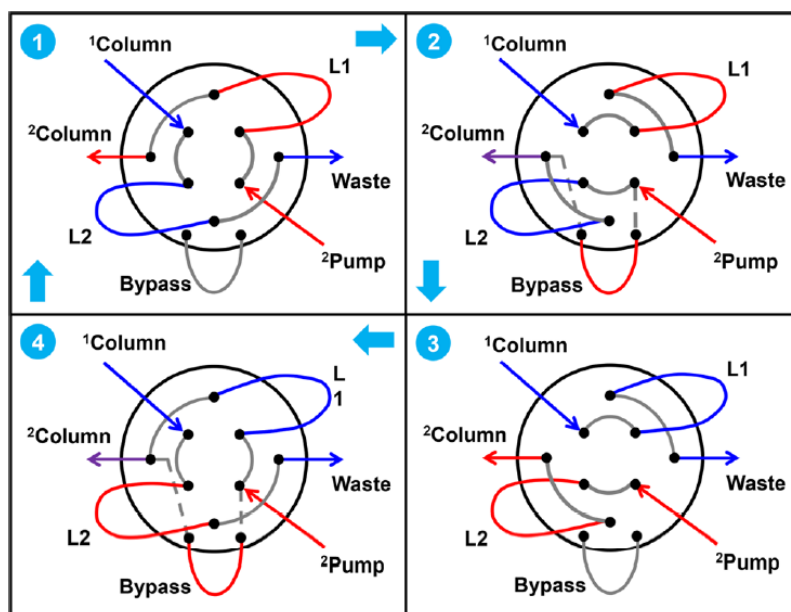
Plnění a vymývání smyček probíhá stejným způsobem jako u osmicestného dvoupolohového ventilu. Za druhou pumpou se nachází dělič toku, který mobilní fázi rozděljuje na dva toky. Jeden tok jde přes zachytávací smyčku a druhý protéká „bypassem“. Oba toky se opět spojí před tím, než se dostanou na kolonu ve druhé dimenzi. Rozdělením toku se dosáhne většího naředění frakce, tím nebude tak výrazně ovlivňovat mobilní fáze první dimenze separaci ve druhé dimenzi. Poměr rozdělení toku lze nastavit, a tak je možnost ovlivnit míru naředění organického rozpouštědla ve frakci. Eluční síla v mobilní fázi pro druhou dimenzi musí být nízká, aby došlo k dostatečnému naředění frakce ve smyčce [5, 30].

Nevýhodou pevného připojení „bypass“ kapiláry je, že frakce ve smyčce bude vymývána menším průtokem, než je celkový průtok mobilní fáze, a tudíž vymývání frakce na kolonu bude trvat delší dobu. Průtok mobilní fáze smyčkou je závislý na poměru dělení v děliči toku. Druhá nevýhoda spočívá v tom, že může dojít

i k nadměrnému naředění eluátu a v důsledku toho nastává problém s detekcí rozseparovaných analytů [5].

1.8.3.2 Aktivní modulace rozpouštědlem

Nadměrné naředění frakce při jejím vymývání na druhou kolonu u pasivní modulace rozpouštědlem je značný problém, protože se analyty o nízké koncentraci nemusí vůbec detekovat. Proto se následný vývoj modulátorů zaměřil na aktivní modulaci rozpouštědlem (ASM – Active Solvent Modulation). Aktivní modulace rozpouštědlem zvyšuje mez detekce a zároveň umožňuje naředění silného elučního činidla ve frakci slabším elučním rozpouštědlem ve druhé mobilní fázi. Je podobná pasivní modulaci rozpouštědlem, ale využívá speciální osmicestný dvoupolohový ventil se dvěma zachytávacími smyčkami. Ventil je speciální v tom, že má navíc dva odtokové porty a čtyři rotační pozice. Jednotlivé pozice ventilu jsou znázorněny na Obrázku 16.



Obrázek 16: Aktivní modulace rozpouštědlem – speciální osmicestný dvoupolohový ventil se dvěma odtokovými porty, zachytávacími smyčkami, přemostěním a jeho jednotlivé pozice při separaci [5].

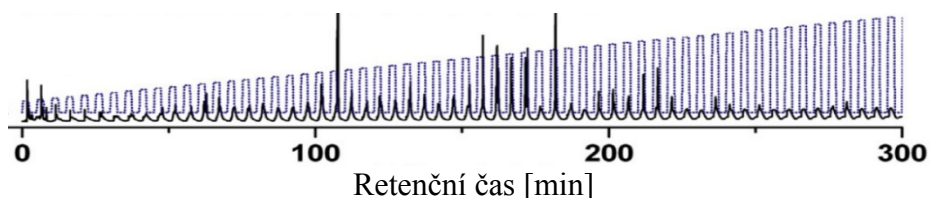
V první pozici dochází k plnění smyčky L2 eluátem z první dimenze a „bypassem“ neprotéká žádná mobilní fáze. Po otočení ventilu do druhé pozice je průtok mobilní fáze pro druhou dimenzi rozdělen na dvě části. První část vymývá eluát ze smyčky L2 a druhý podíl mobilní fáze protéká bypassem mimo smyčku.

Podíly mobilní fáze se za smyčkou opět spojí a pokračují na kolonu ve druhé dimenzi. Po vymytí a naředění obsahu smyčky L2 (obvykle po několika vteřinách) se ventil přepne do třetí polohy, kdy mobilní fáze pro druhou dimenzi protéká pouze smyčkou L2. Současně během fáze ředění a separace obsahu smyčky ve druhé dimenzi dochází k plnění smyčky L1 eluátem z první dimenze. V této pozici ventil zůstává, dokud neproběhne separace frakce ze smyčky L2 ve druhé dimenzi. V poslední pozici ventilu je smyčka L1 vyplachována stejným způsobem jako smyčka L2. Pak se ventil opět přepne do polohy 1 a celý cyklus se opakuje. Pokud se osmicestný ventil připojí ke dvěma selekčním ventilům s více smyčkami, lze aktivní modulaci použít pro vícenásobnou „heard-cutting” nebo selektivní komplexní dvourozměrnou kapalinovou chromatografii.

Aktivní modulace rozpouštědlem zvyšuje kompatibilitu mobilních fází, rozlišení separace a zároveň snižuje citlivost detekce ve druhé dimenzi. Porovnáním píků v chromatogramech získaných při zapojení pevné modulace rozpouštědlem nebo aktivní modulace rozpouštědlem se při separaci s ASM modulátorem získá lepší rozlišení a odstup signálu od šumu [5].

1.8.3.3 Pulzně-eluční modulace

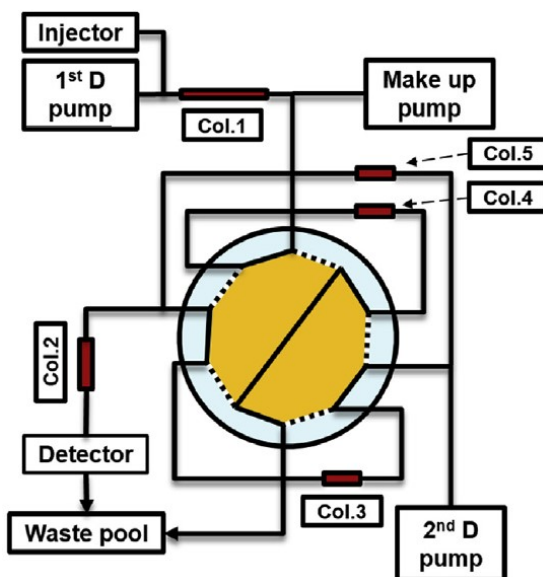
Dalším druhem modulace rozpouštědlem je pulzně-eluční modulace (PE – Pulsed Elution), která využívá k vytvoření frakcí z eluátu pulzně-eluční gradient mobilní fáze v první dimenzi. Gradient v první dimenzi je složen z pulzů, ve kterých se postupně zvyšuje eluční síla rozpouštědla, a tím se vytvoří jednotlivé frakce. Při klasickém gradientu mobilní fáze se koncentrace rozpouštědla se silnější eluční silou postupně zvyšuje s časem, ale u pulzně-eluční modulace koncentrace organického rozpouštědla cyklicky klesá a stoupá a zároveň se lineárně v čase zvyšuje eluční síla (Obrázek 17).



Obrázek 17: Průběh pulzně-elučního gradientu v první dimenzi během separace (modrá křivka) [3].

Gradient v pulzní eluční modulaci se musí optimalizovat, aby při horní hodnotě eluční síly gradientu nedošlo k rychlému pohybu analytů kolonou, a naopak na spodní hladině pulzního intervalu se nesmí neúměrně snížit migrace analytů. Délkou doby pulzu se ovlivňuje píkovaná kapacita, protože čím kratší doba pulzu gradientu, tím se získá více frakcí z první dimenze.

PE modulace využívá deseticestný dvoupolohový ventil se dvěma zachytávacími kolonkami a „bypassem“ (na Obrázku 18 je v „bypassu“ zapojena kolonka col.5) a funguje na principu pasivní modulace rozpouštědlem. „Bypass“ opět umožňuje naředit první mobilní fázi se silnou eluční silou.

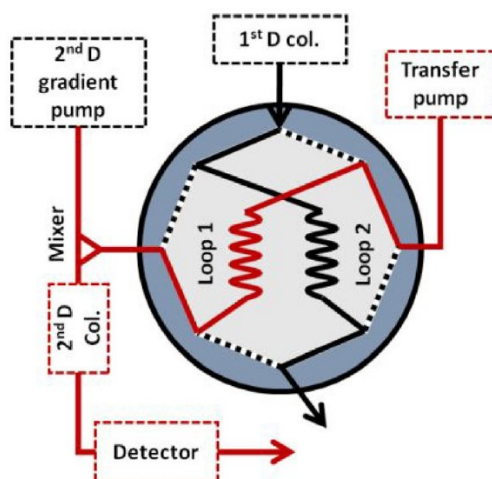


Obrázek 18: Spojení pulzní eluční modulace a pevné modulace rozpouštědlem [3].

Poměr dělení toku byl v této pasivní modulaci rozpouštědlem zajištěn připojením krátké dělicí kolonky (v Obrázku 18 Col.5), která byla naplněna stejnou stacionární fází jako zachytávací kolonky. Vnitřní rozměry dělicí kolonky ovlivňují tlakový odpor průtoku, tedy i poměr dělení toků a stupeň naředití frakce. Například čím kratší kolonka s větším vnitřním průměrem, tím větší bude průtok přemostěním a menší průtok zachytávací kolonkou. Pulzně-eluční modulace vede k vyšší píkované kapacitě, než při zapojení osmicestného dvoupolohového ventilu se zachytávacími smyčkami [3].

1.8.3.4 Modulace ředěním na koloně

Nařazení frakce před vstupem do druhé dimenze nemusí být provedeno jen mobilní fází druhé dimenze, ale je možné využít pomocné rozpouštědlo s nižší eluční silou, kterou se obsah smyčky vymyje. Tato technika se nazývá modulace ředěním na koloně (ACD – At-column dilution). ACD vychází z osmicestného dvoupolohového ventilu se dvěma zachytávacími smyčkami, ale navíc se připojuje další čerpadlo, které frakci ze smyčky vymývá. Nákres rozhraní ředění na koloně je na Obrázku 19. Ředění na koloně poskytuje lepší separace a tvar píků než při použití dvoupolohového ventilu se dvěma smyčkami.



Obrázek 19: Modulace ředěním na koloně [13].

Princip fungování modulátoru ředění na koloně je velmi jednoduchý. Nejprve se eluát z první kolony zachytí ve smyčce. Po otočení ventilu je frakce ze smyčky vymývána pomocným rozpouštědlem s malým průtokem a se slabou eluční silou do mísící cely, kam je dalším čerpadlem přiváděna druhá mobilní fáze o vysokém průtoku. Dojde tak k nařazení mobilní fáze se silnou eluční silou a k zakoncentrování analytů na začátku kolony ve druhé dimenzi. Faktor zředění je možné nastavit pomocí průtoku pomocného rozpouštědla. Ředění eluátu lze nezávisle na podmínkách separace v první a druhé dimenzi nastavit a optimalizovat.

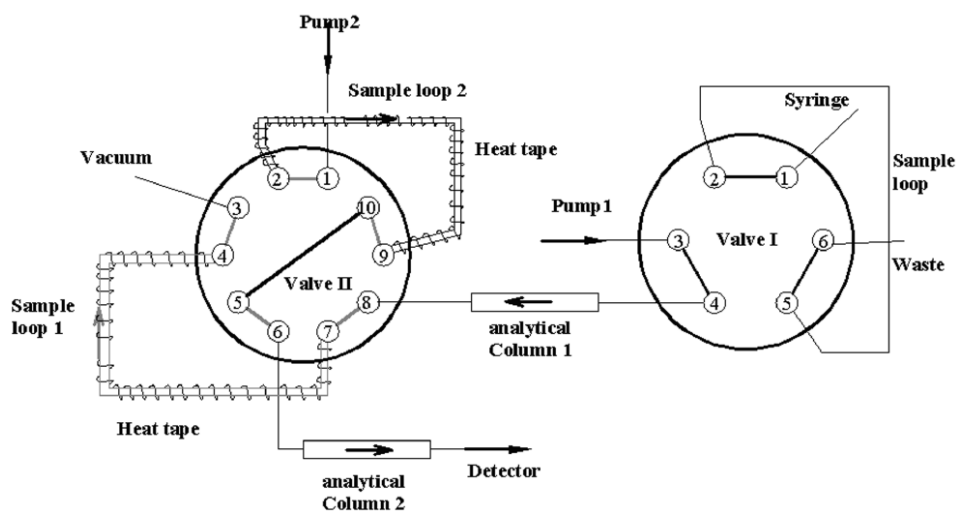
Porovnáním výsledných 2D chromatogramů po separacích s dvoupolohovým ventilem a modulací ředění na koloně se při použití ACD získá více píků (sloučenin) a intenzita píků je větší [13].

1.8.4 Modulace s využitím teploty

Zvýšení teploty, ať už na zachytávacích smyčkách nebo speciální kolonce, umožňuje odpařit mobilní fázi z první dimenze, čímž se odstraní vliv rozpouštědla z první dimenze na separaci ve druhé dimenzi.

1.8.4.1 Modulátor s vakuovým odpařováním

Odpaření mobilní fáze v zachytávacích smyčkách umožňuje rozhraní s vakuovým odpařováním (VEI – Vacuum Evaporation Interface), které sníží dávkovaný objem frakce na druhou kolonu, a analyty se tak zakoncentrují. Modulátor se skládá z dvupolohového deseticestného ventilu, dvou zachytávacích smyček, vakuové pumpy a ohřevu smyček (Obrázek 20).



Obrázek 20: Zapojení modulátoru s vakuovým odpařováním do dvourozměrné kapalinové chromatografie [21].

Princip fungování je podobný jako u deseticestného dvupolohového ventilu. Rozdíl je v tom, že místo portu pro odpad u deseticestného ventilu se u vakuově-odpařovacího modulátoru zapojuje vakuová pumpa (Obrázek 20, port č. 3). Rozhraní pracuje tak, že eluát z první kolony je zachycen ve vyhřívané smyčce a za sníženého tlaku dochází k postupnému odpařování mobilní fáze. Analyty se sorbují na stěnu smyčky a plynná mobilní fáze je odváděna vakuovou pumpou. Po určitém čase vzorkování se deseticestný ventil přepne do druhé polohy. Zachytávací smyčkou začne protékat mobilní fáze pro druhou dimenzi, v níž se

rozpustí zachycené analyty a jsou unášeny na druhou kolonu. Během vymývání jedné smyčky na druhou kolonu dochází k zachycení dalšího eluátu z první dimenze do druhé smyčky a odpaření mobilní fáze z první dimenze.

Modulátor s vakuovým odpařováním zajistí odpaření mobilní fáze z první dimenze, čímž lze jednak odstranit nekompatibilitu mobilních fází, a také se analyty zakoncentrují do úzké zóny na začátku kolony ve druhé dimenzi. Díky tomu jsou píky ve druhé dimenzi užší a vyšší.

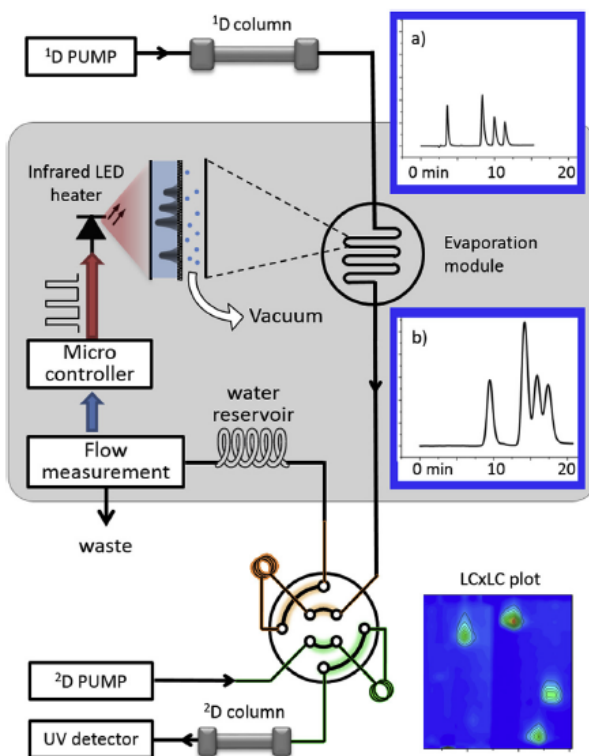
Pomocí VEI modulátoru lze separovat i těkavé a tepelně labilní analyty. Při odpařování mobilní fáze se využívá vakuum, proto je teplota varu mobilní fáze nízká a může se snížit na laboratorní teplotu. Nevýhodou modulátoru s vakuovým odpařováním je, že při odpařování může dojít ke ztrátě analytů, protože páry mobilní fáze mohou spolu strhnout separované analyty. Výtěžnost separace netěkavých analytů se tak pohybuje i pod 60 %. Z tohoto důvodu se pro kvantifikaci látek ve vzorku musí přidávat vnitřní standard [21].

1.8.4.2 Rozhraní s odpařovací membránou

Určitou nástavbou vakuově-odpařovacího modulátoru je modulace s odpařovací membránou (EMM – Evaporate Membrane Modulation). Místo vyhřívaných smyček používaných u vakuově-odpařovacího rozhraní lze do dvourozměrného kapalinového chromatografu zapojit odpařovací membránu, kterou projdou pouze malé molekuly mobilní fáze. Díky tomu se eliminuje nevýhoda vakuově-odpařovacího rozhraní, kde docházelo ke ztrátě analytů v důsledku strhávání molekul s plynou fází. Schéma zapojení odpařovací membrány do dvourozměrného kapalinového chromatografu je na Obrázku 21.

Mezi výstup z první dimenze a ventil se dvěma zachytávacími smyčkami je vložena porézní polytetrafluorethylenová hydrofobní membrána, která je zahřívána infračervenými diodami na konstantní teplotu odpařování pro odpaření části mobilní fáze, aby byl zachován konstantní průtok z první dimenze. Plynná fáze nízkovroucích rozpouštědel z první dimenze se odvádí pomocí vakuové pumpy přes membránu do odpadu. Přes porézní membránu analyty neprojdou a jsou

odváděny do smyčky, kde se zachytí. Ze zachytávací smyčky jsou analyty vymyty mobilní fází pro druhou dimenzi.

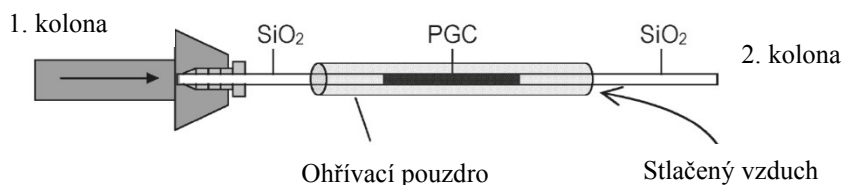


Obrázek 21: Zapojení odpařovací membrány mezi první dimenzí a duo čtyřcestný dvoupohový ventil. Chromatogram a) znázorňuje separaci v první dimenzi a chromatogram b) ukazuje analyty po odpaření mobilní fáze [4].

Modulátor s odpařovací membránou umožňuje zvýšit průtok v první dimenzi, protože přebytek mobilní fáze se odpaří a do druhé dimenze se dávkuje pouze analyty. Druhou výhodou použití je separace i těkavých a tepelně labilních látek, protože vakuum snižuje teplotu varu rozpouštědel v mobilní fázi pro první dimenzi [4].

1.8.4.3 Tepelná modulace

Kromě odpařovací membrány se pro odstranění mobilní fáze a fokusaci analytů z první dimenze využívá speciální kolonka používaná v tepelné modulaci (TM – Thermal Modulation). Eluát se zachytává v kapiláře z taveného Al_2O_3 , která je obalena hliníkovým pouzdem a naplněna oxidem křemičitým a porézním grafitovým uhlíkem (PGC). Konstrukce modulátoru je znázorněna na Obrázku 22.



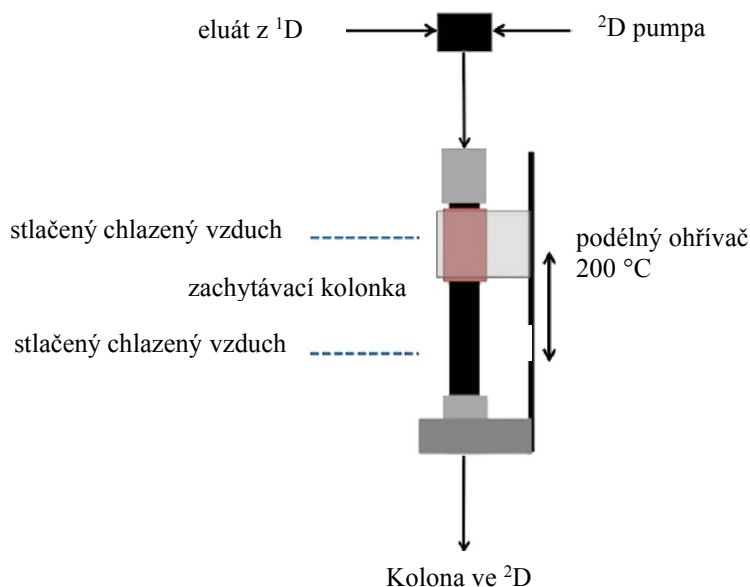
Obrázek 22: Tepelná modulace, která se skládá z hliníkového ohřivacího pouzdra a kapiláry naplněné SiO_2 a porézním grafitovým uhlíkem [31].

Porézní grafitový uhlík má nižší molární entalpii než například oktadecylsili-kagel, a proto jsou interakce analytů s povrchem stacionární fáze citlivější na vyšší teplotu. Zároveň je grafitový uhlík stálý při vyšších teplotách, a proto se používá při tepelné modulaci. Záchytem neutrálních analytů na porézním grafitovém uhlíku se analyty zaostří do úzké zóny před tím, než jsou dávkovány do druhé dimenze. Místo porézního grafitového uhlíku lze použít i jinou stacionární fázi a zachytit tak i jiné analyty, například kyselé nebo zásadité. Podmínkou je, aby retence látek na stacionární fázi byla mnohonásobně větší než na první koloně.

Princip je následující: při pokojové teplotě analyty interagují s porézním grafitovým uhlíkem a zachytí se. Po zahřátí kapiláry na vysokou teplotu (až $160\text{ }^\circ\text{C}$) dojde k postupnému uvolňování analytů na kolonu ve druhé dimenzi. Pro rychlý ohřev kolonky slouží topná cívka, která ohřívá hliníkové pouzdro, ve kterém je umístěna kapilára. Zahřívání porézního grafitového uhlíku probíhá v pulzech. Kapilára musí mít malý vnitřní průměr, aby ohřev proběhl rychle a v celém jejím objemu. Když dojde k ohřátí mobilní fáze uvnitř modulátoru, sníží se její viskozita, tím dochází ke snížení tlaku v kapiláře. Ten se opět zvýší až při ochlazení mobilní fáze v modulátoru. Použití tepelné modulace ve dvourozměrné kapalinové chromatografii je spíše výjimečné, ale častěji se využívá ve dvoudimenzionální plynové chromatografii [31].

1.8.4.4 Podélná on-column tepelná modulace

Kolonka naplněná porézním grafitovým uhlíkem se využívá i při podélné on-column tepelné modulaci (LOCTM – Longitudinal On-Column Thermal Modulation). Modulátor se skládá ze zachytávací kolony s porézním grafitovým uhlíkem, odporově vyhřívaného pouzdra kolony a přívodu stlačeného chlazeného vzduchu. Konstrukce je znázorněna na Obrázku 23. Zachytávací kolonka je podélně vyhřívána. Ohřívač se pohybuje od jednoho konce kolonky ke druhému a zase zpět.



Obrázek 23: Konstrukce tepelné on-column podélné modulace [32].

Zachytávací kolonka se na začátku a na konci chladí stlačeným vzduchem, aby se analyty zachytily na stacionární fázi. Rychlé a velké změny teploty na zachytávací kolonce umožní zachycení a rychlé uvolnění analytů ze stacionární fáze. Pokud se špatně zvolí teploty chlazení a zahřívání, může dojít k předčasné eluci analytů, nebo naopak se analyty z kolonky neuvolní a přejdou do následující frakce.

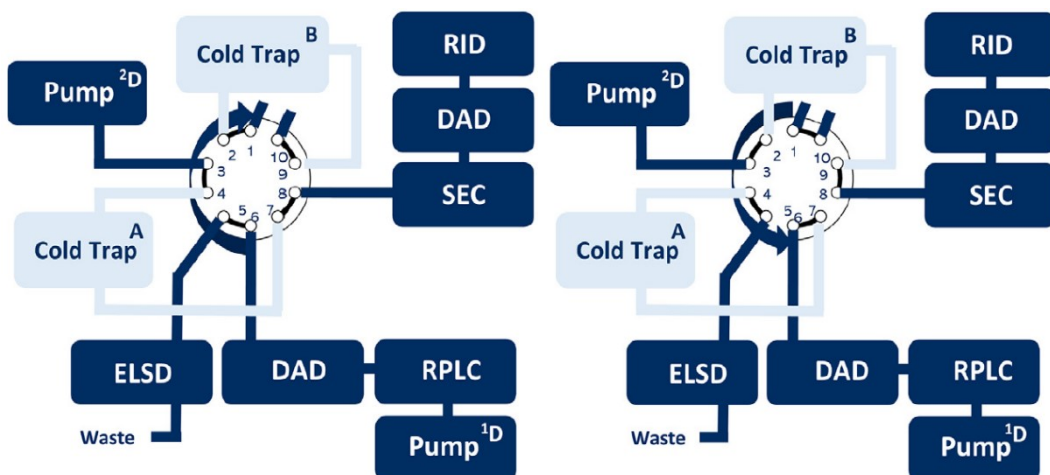
Princip fungování modulátoru spočívá v tom, že eluát z první dimenze proudí do směšovací komůrky, kam se přivádí mobilní fáze pro druhou dimenzi. Směs je vedena do zachytávací kolonky, která je na počátku chlazena stlačeným vzduchem. Následně se podélné vyhřívání přesune na začátek kolonky, tím přeruší proud chladícího vzduchu a kolonka se ohřeje. Zvýšená teplota uvolní analyty, které putují na konec zachytávací kolonky, kde se opět zachytí, protože je druhý konec

kolonky také chlazen proudem stlačeného vzduchu. Pak se podélný ohřívač přesune na konec zachytávací kolonky a analyty se v důsledku zvýšené teploty uvolní na kolonu ve druhé dimenzi.

Výhodou podélné on-column tepelné modulace je zvýšení píkovej kapacity 2D separace oproti běžným modulátorům se smyčkami. Nevýhodou tepelné modulace je delší čas potřebný pro převedení frakce z první do druhé kolony, omezený výběr stacionárních fází a průtoku druhé mobilní fáze, aby nedošlo k překročení tlaku na druhé koloně [32].

1.8.4.5 Modulace zachytáváním za studena

Modulace s využitím tepla nemusí být provedena pouze vyšší teplotou, ale lze pro záchyt analytů využít naopak i nízkou teplotu. Modulace zachytáváním za studena (CT – Cold Trapping) umožňuje fokusaci analytů ve frakci. Zachytávání za studena je vhodné pro analyty, které mají určitou retenci i při nízkých teplotách. Konstrukce modulátoru se skládá z deseticestného dvoupolohového ventilu a dvou zachytávacích kolonek, které jsou chlazeny (Obrázek 24).



Obrázek 24: Zapojení modulace zachytáváním za studena do separačního systému. V pozici A probíhá plnění zachytávací kolonky. Pozice B názorňuje vymývání kolonky B na kolonu ve druhé dimenzi [6].

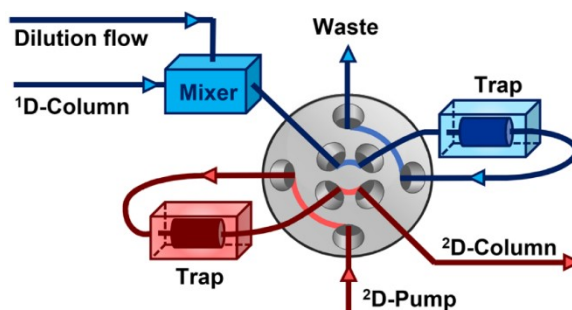
Zachytávací kolonky musí obsahovat stacionární fázi, ve které mají analyty vysokou retenci. Takovou stacionární fází je například porézní grafitový uhlík nebo oktadecyl-silikagel. Výběr stacionární fáze závisí na separovaných analytech. Do chlazené zachytávací kolonky proudí eluát z první dimenze, který má vyšší

teplotu (v Obrázku 24 pozice A). Změnou teploty se analyty zachytí na stacionární fázi. Čím je rozdíl teplot větší a molekulová hmotnost analytů větší, tím se více zachytí. Pro zachycení malých analytů je potřeba použít velký teplotní rozdíl. Po zachycení analytů a otočení ventilu se kolonka ohřeje a analyty jsou vymývány mobilní fází na kolonu ve druhé dimenzi (pozice B na Obrázku 24).

Modulace zachytáváním za studena má výhodu v tom, že ve druhé dimenzi je možné použít kratší kolonu (30 mm místo 60 mm) s malým vnitřním průměrem (2,1 mm místo 7,5 mm) než u klasických kolon pro druhou dimenzi, a tak zrychlit celkovou analýzu vzorku. Ve druhé dimenzi lze zapojením kratší kolony také snížit průtok mobilní fáze (0,6 ml/min místo 2,5 ml/min), které usnadňuje spojení s hmotnostní spektrometrií. Modulátor má ale i nevýhodu, a to ve ztrátě analytů během průtoku eluátu zachytávací kolonkou a při vymývání frakce na druhou kolonu. Ztrátu je možné snížit, pokud se zachytávací kolonka propláchne druhou mobilní fází v opačném směru, než probíhalo plnění kolonky [6].

1.8.5 Modulace stacionární fázi

Aktivní modulace nemusí být vytvořena jen rozpouštědlem nebo teplotou, ale lze použít i asistovanou modulaci stacionární fázi (SPAM – Stationary-Phase-Assisted Modulation). Stacionární fáze v zachytávací kolonce umožňuje výměnu mobilních fází a zakoncentrování analytů před separací ve druhé dimenzi, protože mobilní fáze z první dimenze se v kolonce nezachytí a odchází do odpadu. Zachytávací kolonky dále umožňují odsolení eluátu z první dimenze, což následně umožňuje spojení dvourozměrné kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem, která se s výhodou používá v proteomice. Konstrukce asistované modulace stacionární fázi je znázorněna na Obrázku 25 [12, 33].



Obrázek 25: Asistovaná modulace stacionární fáze je složena z: duo čtyřcestného dvoupolohového ventilu a dvou kolonek naplněných stacionární fáze [12].

Pro zachycení frakcí z první dimenze slouží dvě zachytávací kolonky. Před kolonku se často zapojuje přídatný tok rozpouštědla, který upraví podmínky pro zachycení analytů snížením eluční síly mobilní fáze, a tím se zabrání předčasné eluci analytů z kolonky. Analyty se zachytí na stacionární fázi, která se volí podle povahy separovaných analytů. Mobilní fáze z první dimenze je odváděna do odpadu. Když se ventil otočí, zachycené analyty jsou vymývány mobilní fází pro druhou dimenzi na druhou kolonu. Podmínkou pro výběr stacionární fáze v zachytávací kolonce je, že retence látek v kolonce musí být větší než retence látek na koloně v první dimenzi, aby se zachycené analyty v kolonce rychle vymyly na druhou kolonu [12, 33]. Zachytávací kolonky je možné vymývat v obou směrech. Eluát z první dimenze se zachytí na začátku kolonky a díky zpětnému promytí malým objemem mobilní fáze dojde k fokusaci analytů a zrychlení dávkování frakce na druhou kolonu [33].

Při porovnání asistované modulace stacionární fází s dvoupolohovým ventilem se zachytávacími smyčkami se zvyšuje citlivost detekce, snižuje se nekompatibilita separačních systémů a může dojít ke zrychlení separace. Zkrácení doby separace se dosáhne tím, že lze zvýšit průtok mobilní fáze v první dimenzi. Zachytávací kolonky dovolí zachytit více eluátu, než je vlastní objem kolonky. Důležité je brát ohled na to, aby nedošlo k podvzorkování. Další výhodou je zvýšení píkovej kapacity a účinnosti separace, protože se sníží dávkovaný objem do druhé dimenze [12].

1.8.6 Budoucnost vývoje modulátorů

I když se vyvíjí stále nové modulátory pro přenos frakcí z první do druhé dimenze, stále nejvíce používanými jsou dvoupolohové ventily se dvěma zachytávacími smyčkami, které nemají fokusační efekt a neumožňují výměnu mobilních fází. Nově vyvíjené modulátory často vychází z osmi- nebo deseticestného dvoupolohového ventilu, ať už se smyčkami nebo zachytávacími kolonkami. Lze předpokládat, že v budoucnu bude věnována větší pozornost modulátorům pro dosažení větší separační účinnosti, robustnosti a možnosti využití dvourozměrné kapalinové chromatografie pro separace v praktických aplikacích [19].

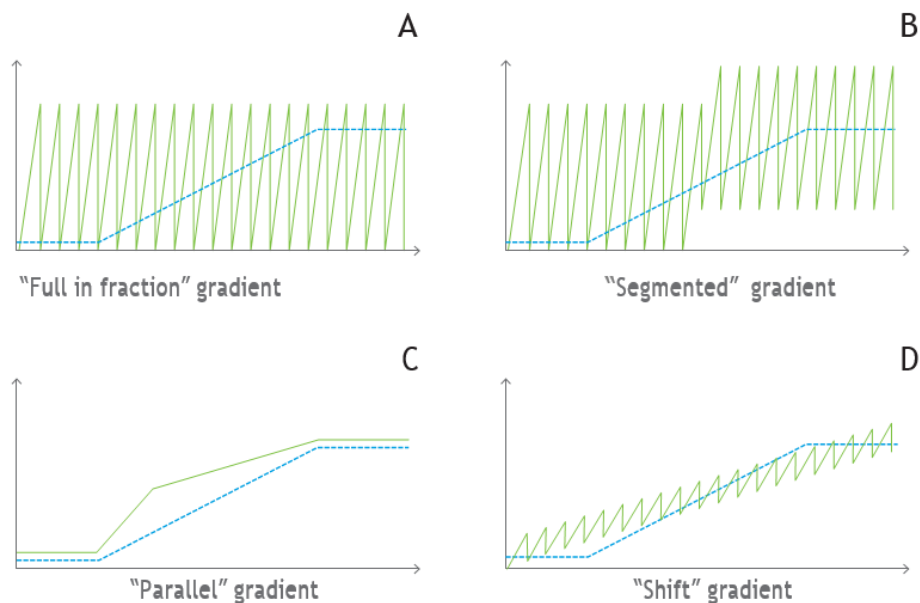
1.9 Gradientová eluce ve dvourozměrné kapalinové chromatografii

Gradientová eluce mobilní fáze se při separaci využívá pro zvýšení píkové kapacity v obou dimenzích. Gradientovou elucí se získají stejně široké a vysoké píky s rovnoměrnějšími rozestupy [1]. Při volbě typu a rozsahu gradientu se musí brát ohled na přítomné analyty ve vzorku [2]. Gradient mobilní fáze ve druhé dimenzi se také volí podle použitých separačních systémů, aby se dosáhlo vyšších ortogonalit [34].

Pokud bude gradient mobilní fáze použit v první dimenzi, získá se konstantní počet píků za první kolonou. Za to gradient mobilní fáze ve druhé dimenzi způsobí lepší využití plochy 2D chromatogramu, protože volbou vhodného gradientu můžeme podpořit eluci silně zadržovaných látek, a i naopak zvýšit retenci slabě zadržovaných sloučenin. Ve druhé dimenzi má také na starosti vymytí všech analytů z kolony, aby nedocházelo k eluci zbytkových analytů v následující separaci [1, 2]. Aplikací gradientu ve druhé dimenzi dochází také k fokusaci analytů na začátku kolony. Analyty unášené mobilní fází se slabou eluční silou při kontaktu se začátkem stacionární fáze ztrácí rychlost, a tak je mohou dohnat i analyty, které se nachází na konci objemu frakce [2].

Podle profilu se gradienty dělí na čtyři typy [1]:

- plný gradient (Obrázek 26A),
- segmentový gradient (Obrázek 26B),
- paralelní gradient (Obrázek 26C) a
- posuvný gradient (Obrázek 26D).



Obrázek 26: Průběhy jednotlivých typů gradientů v LC×LC: A) plný gradient, B) segmentový gradient, C) paralelní gradient, D) posuvný gradient. Modrá křivka znázorňuje gradient v první dimenzi a zelená křivka určuje průběh gradientu ve druhé dimenzi [2].

U paralelního gradientu („parallel gradient“) dochází k postupnému zvyšování silnější eluční složky v průběhu gradientu jak v první, tak ve druhé dimenzi. Gradienty v obou dimenzích mají nejčastěji stejný průběh. Paralelní gradient se často používá pro separační systémy, u nichž dochází k částečné korelaci, jako například u RP×RP [1]. Stejné gradienty v obou dimenzích sníží korelaci systémů, a tím se jednotlivé píky látek lépe rozprostřou po prostoru chromatogramu a zvýší se tak ortogonalita systému [35]. Také se použitím méně strmého paralelního gradientu ve druhé dimenzi zajistí to, že se všechny látky separované v jedné frakci na druhé koloně vymyjí a nebudou tak přecházet do následující separace. Nevýhoda paralelního gradientu je v rozmývání nebo deformace píků ve výsledném chromatogramu a v důsledku toho ztížení identifikace eventuálně i kvantifikace látek. Problém nastává hlavně u sloučenin, které se eluují ve více frakcích z první

dimenze, protože se snižuje retence látek při přenosu do druhé dimenze, kde mobilní fáze má vyšší eluční sílu než v první dimenzi [34].

Plný gradient, též nazývaný „Full In Fraction,“ (FIF) využívá jeden stejný rozsah gradientu na všechny frakce separované ve druhé dimenzi. Dochází k nárůstu koncentrace silnějšího rozpouštědla (někdy až na 100 %) a na konci gradientu, tedy na konci separace jedné frakce, se koncentrace silného elučního činidla snižuje na výchozí složení mobilní fáze [1]. Aby se ustálily počáteční podmínky gradientu, je potřeba kolonu po skončení každé separace (každé frakce) ve druhé dimenzi vypláchnout dvakrát až třikrát výchozím složením mobilní fáze [2]. FIF je nejčastěji využívaný gradient pro druhou dimenzi. Gradient má široký rozsah, který zaručí dobrou separaci, ale poskytuje horší rozlišení. Píky ve 2D záznamu nezaujmají celý prostor, ale jsou rozloženy spíše na přímce jako u systému s částečnou ortogonalitou (Obrázek 7B) [18].

Segmentový gradient (Segmented In Fraction, SIF) ve druhé dimenzi používá nižší rozsah koncentrace silnějšího rozpouštědla než plný gradient. Gradient se skládá z několika segmentů s různým rozsahem, které jsou použity v různých částech separace ve druhé dimenzi [1].

Při použití posuvného gradientu neboli „shift gradient,“ dochází k postupnému navyšování počáteční a koncové koncentrace silnější složky mobilní fáze ve druhé dimenzi pro všechny analyzované frakce [1].

Nevýhodou plného gradientu je, že ve výsledném 2D chromatogramu se nevyužije celá jeho plocha. Tedy plný gradient poskytuje horší separaci než segmentový gradient, ale u obou typů gradientů se musí na konci každé analýzy jednotlivých frakcí kolona promýt počátečním složením mobilní fáze [2, 34]. Naproti tomu posunutý a paralelní gradient má rozmístěné píky analytů i v místech, kde je plný gradient nemá. Výhoda plného a segmentového gradientu je v tom, že dochází k vyšší kompresi píků, protože se používají strmější gradienty, a tak se získají vyšší píky a větší odstup signálu od šumu [1]. Nevýhodou posuvného gradientu je těžší interpretace záznamů, protože během separace se mění gradient mobilní fáze, a tak se může posouvat retenční čas jedné látky v sousedních frakcích separovaných ve druhé dimenzi [1, 2].

Gradient lze charakterizovat například parametrem strmosti. Strmost gradientu vyjadřuje změnu objemového podílu složky s vyšší eluční silou v mobilní fázi během průběhu gradientu. Čím je nižší strmost gradientu mobilní fáze, tím více separace simuluje izokratickou eluci. Ve dvourozměrné kapalinové chromatografii se v první dimenzi volí pozvolnější strmost gradientu, ale ve druhé dimenzi se používají velmi strmé gradienty pro rychlé separace. Strmost gradientu mobilní fáze, B , lze vypočítat podle Rovnice 3:

$$B = \frac{\varphi_{org.f.} - A_{org.f.}}{V_G} \quad (3)$$

kde $\varphi_{org.f.}$ představuje koncentraci organické složky v mobilní fázi na konci gradientu, $A_{org.f.}$ je počáteční koncentrace organické složky na začátku gradientu mobilní fáze a V_G odpovídá objemu mobilní fáze v gradientu v ml [2, 35].

1.10 Využití dvourozměrné kapalinové chromatografie

Dvourozměrná kapalinová chromatografie má vyšší separační účinnost a píkovou kapacitu než jednorozměrná kapalinová chromatografie, proto význam této techniky stále roste a s tím i potenciál využití dvoudimenzionální kapalinové chromatografie v praxi. Výhodou zavedení separací na dvourozměrném kapalinovém chromatografu je, že u některých aplikací odpadá složitá příprava vzorku [36]. Na druhou stranu délka analýz komplexních vzorků představuje značnou nevýhodu oproti jednorozměrné kapalinové chromatografii, a zvláště oproti ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografii. Tuto nevýhodu převáží získání většího množství informací při použití dvourozměrné kapalinové chromatografie. V současné době je snaha zkracovat čas potřebný pro analýzu, a vyvíjet tak rychlejší metody, které by bylo možné použít v rutinní analýze [2].

Největší uplatnění dvourozměrná kapalinová chromatografie našla při analýze syntetických polymerů a kopolymerů [6]. Dále se využívá pro analýzu biologických materiálů, jako je krev a moč. V této oblasti se hlavně používá v proteomice pro stanovení různých biomarkerů a metabolitů signalizujících počátek onemocnění [33]. Metodu je výhodné použít i pro vzorky životního prostředí [2, 31, 37].

Velmi významnou oblastí, kde se používá dvourozměrná kapalinová chromatografie, je analýza potravin, protože se často jedná o velmi komplexní vzorky s řadou analytů s různými vlastnostmi. Analýzy mohou být zaměřeny na hledání konkrétní skupiny látek ve vzorku z důvodu bezpečnosti potravin (např. přítomnost xenobiotik) nebo na identifikaci všech nebo pouze části přítomných analytů ve vzorku (např. antioxidanty ve víně). Pokud nás nezajímá konkrétní složení jednotlivých látek v konkrétní potravíně, lze separací vytvořit charakteristický 2D chromatogram, tak zvaný otisk prstu. Při porovnání charakteristických píků v konturových chromatogramech vzorku a standardní potraviny je možné odhalit falšování potravin (např. sójové bílkoviny v masných výrobcích) nebo geografický původ potraviny (např. maďarské víno vydávané za české) [36].

Nejčastěji separovanými skupinami analytů jsou [17, 36]: triacylglyceroly [23], karoteny [20], fosfolipidy [24], polyfenolické látky [4, 38], glykosidy z rostliny *Stevia rebaudiana* [39] a kontaminanty, mezi které se řadí pesticidy [40], antibiotika [41] a toxické láky [37].

Mezi nejvíce analyzované komodity potravin spadá [17]: víno [35], pivo [42], mléko [24, 41], oleje [23], obiloviny a mouka [37, 40], ovoce a zelenina [26, 40], ovocné džusy [43] a voda [8, 10].

2 Experimentální část

2.1 *Přístroje a zařízení*

- dvoudimenzionální kapalinový chromatograf Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), složený z těchto částí:
 - automatický dávkovač vzorku
 - kapilární čerpadlo pro první dimenzi
 - ultra-vysokotlaké čerpadlo pro druhou dimenzi
 - termostat kolon
 - UV/VIS detektor diodového pole
- chromatografické kolony:
 - kapilární zwitteriontová methakrylátová monolitická kolona na bázi N,N-dimethyl-N-methakryloxyethyl-N-(3-sulfopropyl)amonium betainu (MEDSA) a bisfenol-A-glycerol dimethakrylátu (BiGMA) o rozměrech 250×0,53 mm. Kolona má duální charakter, což znamená, že ji lze použít jak v HILIC systému s vysokou koncentrací acetonitrilu v mobilní fázi, tak i v reverzní fázi s vodnou mobilní fází (laboratorně připravená *in situ* polymerizací v kapiláře, Univerzita Pardubice) [44]
 - kolona Chromolith HighResolution o velikosti 50×4,6 mm (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
- rozhraní:
 - duo čtyřcestný dvoupolohový ventil (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) se zachytávacím zařízením:
 - dvě smyčky o objemu 20 μ l (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
 - dvě kolonky Kinetex[®] 5u EVO C18 100 Å se stacionární fází C18, 20×4 mm, velikostí částic 5 μ m a velikostí pórů 100 Å (Phenomenex, Torrance, USA)
 - dvě kolonky EXP[®] Trap Column Cartridges 15-03973-HG s C18 stacionární fází, 5×2,1 mm, velikostí částic 3 μ m

- a objemem předkolonky 20 μl (Optimize Technologies Inc., Oregon City, USA)
 - dvě kolonky EXP[®] Trap Column Cartridges 15-03973-HJ naplněné silikagelovými částicemi o velikosti 3 μm , 5 \times 2,1 mm a objemu 20 μl (Optimize Technologies Inc., Oregon City, USA)
 - modulace ředěním na koloně se skládala z duo čtyřcestného dvoupolohového ventilu, dvou zachytávacích smyček o objemu 20 μl a směšovače toku (jednotlivé komponenty od Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
 - třísmýčkový modulátor složený z jednoho dvanácticestného dvoupolohového ventilu, dvou deseticestných dvoupolohových ventilů a tří smyček o objemu 20 μl s vnitřním průměrem 0,2 mm (Valco Instruments Co. Inc., Houston, USA)
- kapilární elektroforéza Agilent 7100 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) složená z:
 - tlakového čerpadla
 - dvou platinových elektrod
 - křemenné kapiláry potažené polyimidem o vnitřním průměru 75 μm a délce 75 a 120 cm
 - detektoru diodového pole
- deseticestný dvoupolohový ventil vyrobený z nevodivého materiálu PEEK (polyetheretherketon) pro propojení kapilární elektroforézy s třísmýčkovým modulátorem (Valco Instruments Co. Inc., Houston, USA)
- syringe (injekční) pumpa NE-1000X (Labicom s.r.o., Praha, Česká republika)
- vakuový odplyňovač mobilní fáze Esa DG 3014 (ECOM spol. s. r. o., Praha, Česká republika)
- čerpadlo Esa 582 Solvent Delivery System (Esa, Chelmsford, Velká Británie)

- Hamilton stříkačky 1725 RNR o objemu 250 μ l (Chromservis, Praha 10 – Petrovice, Česká republika)
- analytické váhy Kern ABT 220-4M (Fisher Scientific, Pardubice, Česká republika)
- ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex TK 52 (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlín, Německo)
- automatické pipety Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- IKA[®] Vortex 1 (VWR International, Stříbrná Skalice, Česká republika)
- zařízení na výrobu ultračisté vody Milli-Q[®] Direct (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
- aparatura na filtraci mobilní fáze S&S Duran[®] (Schott, Mainz, Německo)
- membránová vývěva (KNF, Freiburg im Breisgau, Německo)
- pH-metr CG 842 (Schott Geräte GmbH, Hofheim, Německo)
- filtr o velikosti póru 0,45 μ m (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- běžné laboratorní sklo a pomůcky

2.2 Chemikálie

- ultračistá voda
- acetonitril o čistotě $\geq 99,9$ % (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- octan amonný o čistotě $\geq 99,99$ % (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- kyselina mravenčí o čistotě ≥ 98 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- plynný dusík o čistotě 4.6 (Linde Gas a.s., Praha 9 – Kyje, Česká republika)
- aceton o čistotě ≥ 99 % (Penta, Praha 10, Česká republika)
- borátový pufr o koncentraci 0,01 mol/l (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- kyselina boritá o koncentraci 0,075 mol/l, jejíž pH bylo 1 M NaOH upraveno na hodnotu 9 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- standardy fenolických kyselin (Tabulka 4) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Tabulka 4: Seznam použitých standardů fenolických kyselin pro separaci a jejich absorpční maxima λ_{MAX} .

číslo	sloučenina	λ_{MAX} [nm]
1	kyselina gallová	218, 272
2	kyselina protokatechuová	220, 260, 292
3	kyselina <i>p</i> -hydroxybenzoová	198, 256
4	kyselina salicylová	203, 235, 300
5	kyselina vanilová	220, 260, 292
6	kyselina syringová	220, 274
7	kyselina 4-hydroxyfenyloctová	196, 224, 275
8	kyselina kávová	218, 322
9	kyselina sinapová	197, 236, 322
10	kyselina <i>p</i> -kumarová	228, 310
11	kyselina ferulová	218, 323
12	kyselina chlorogenová	217, 325

2.3 Pracovní podmínky

2.3.1 Podmínky 2D-LC separace

V první dimenzi byla pro separaci fenolických kyselin využita kapilární zwitteriontová methakrylátová monolitická kolona BiGMA-MEDSA, která byla provozovaná v HILIC režimu. Mobilní fáze se skládala z 10 mM roztoku octanu amonného ve vodě pufovaného kyselinou mravenčí na pH 3,1 (MF(A)_{D1}) a 10 mM roztoku octanu amonného v acetonitrilu (MF(B)_{D1}). Mobilní fáze musí být pufovaná octanem amonným z důvodu udržení stálé iontové síly při separaci. Pro separaci na první koloně byl nastaven gradient organické a vodné fáze, který je uveden v Tabulce 6. Tlak na koloně rostl tím, jak se zvyšovala koncentrace vodné fáze v gradientu mobilní fáze. Průtok mobilní fáze v první dimenzi byl nastaven na 6 μ l/min.

Ve druhé dimenzi byla pro separaci v reverzní fázi použita monolitická kolona Chromolith HighResolution s oktadecyl-silikagelovou stacionární fází. Mobilní fáze se skládala z acetonitrilu (MF(B)_{D2}) a 10 mM roztoku octanu amonného ve vodě pufovaného kyselinou mravenčí na pH 3,1 (MF(A)_{D2}). Pro separaci

na druhé koloně byl nastaven „full in fraction“ gradient (FIF), který je uveden v Tabulce 7.

Průtok mobilní fáze pro druhou dimenzi byl pro každý použitý typ modulátoru s připojeným zachytávacím zařízením odlišný, protože ať už trapovací kolonky nebo smyčky přinesly do systému jiný tlakový odpor, a tedy byl i jiný tlak na druhé koloně. Průtok byl volen na hranici maxima tlaku na koloně (200 bar) tak, aby nedošlo k jeho překročení během průběhu gradientu. Průtoky nastavené u jednotlivých modulátorů se zachytávacími smyčkami nebo kolonkami jsou uvedeny v Tabulce 5. Tlak na koloně během průběhu gradientu rostl a klesal se změnou složení mobilní fáze a její viskozity.

Tabulka 5: Průtoky mobilní fáze ve druhé dimenzi při použití různých typů modulátorů se zachytávacími smyčkami nebo kolonkami.

Modulátor	zkratka	$F_{m, D2}$ [ml/min]
Duo čtyřcestný dvoupolohový ventil se dvěma smyčkami	AG-smyčky	3,5
Duo čtyřcestný dvoupolohový ventil se dvěma kolonkami HILIC	AG-trapHILIC	2,0
Duo čtyřcestný dvoupolohový ventil se dvěma kolonkami C18 o délce 5 mm	AG-trapC18-5	2,0
Duo čtyřcestný dvoupolohový ventil se dvěma kolonkami C18 o délce 20 mm	AG-trapC18-20	2,4
Třísmyčkový modulátor se třemi smyčkami	TSM-smyčky	2,8
Třísmyčkový modulátor se třemi kolonkami C18 o délce 20 mm	TSM-trapC18-20	2,4
Modulace ředěním na koloně	ACD	3,5

Dávkovaný objem pracovního vzorku fenolických kyselin byl 0,2 μ l. Čas přepnutí modulátoru do další pozice byl nastaven na 1 minutu. Kolony pro první i druhou dimenzi, AG-smyčky, AG-trapHILIC, AG-trapC18-5, AG-trapC18-20 a ACD byly umístěny do termostatu vyhřívaného na teplotu 50 °C.

Detektor snímal signál při vlnové délce 254 a 250 nm rychlostí 40 Hz. Zároveň zaznamenával celé spektrum v rozsahu vlnových délek 200–600 nm, které bylo

použito pro identifikaci fenolických kyselin na základě vlnové délky, kde má daná sloučenina největší absorpenci (Tabulka 4).

UV spektrum zaznamenané při 254 nm bylo použito pro vyhodnocení šířky píku v polovině jeho výšky, $w_{1/2h}$, protože tato vlnová délka je univerzálnější a absorbuje více látek. Následně byla spočítána šířka píku při základně, w , podle Rovnice 4 [1]:

$$w = \frac{4 \times w_{1/2h}}{2,354} \quad (4)$$

Spektrum změřené při 280 nm je selektivnější a některé látky poskytují vyšší signály, proto byl záznam použit pro vyhodnocení výšky píku kyseliny sinapové (v Tabulce 4, číslo 9) a výšky šumu detektoru. Kyselina sinapová se z první dimenze eluuje jako první, a tedy její výška není ovlivněna dalšími koelujícími kyselinami. Hodnocení šumu bylo provedeno tak, že byl spočítán odstup signálu od šumu, S/N , podle Rovnice 5, kdy h představuje výšku píku kyseliny sinapové a h_s odpovídá výšce šumu.

$$S/N = \frac{h}{h_s} \quad (5)$$

Experimentální data byla pomocí programu Eval 2D-verze 2.71Lite převedena na konturové 2D chromatogramy. Ve 2D chromatogramech byly identifikované píky sloučenin označeny číslem daného standardu fenolické kyseliny podle Tabulky 4.

Veškerá voda použitá při praktické části diplomové práce, byla připravena na přístroji Milli-Q[®] Direct a je označena jako ultračistá.

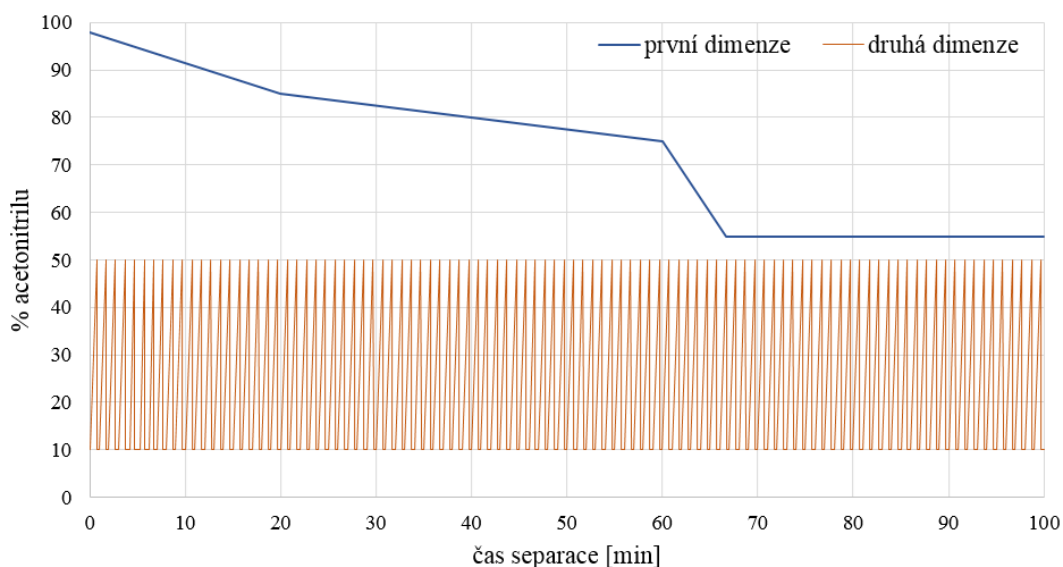
2.3.2 Gradienty mobilních fází

Gradient mobilní fáze pro první dimenzi byl připraven smícháním roztoku 10 mM octanu amonného ve vodě pufrovaného kyselinou mravenčí na pH 3,1 (MF(A)_{D1}) a 10 mM octanu amonného v acetonitrilu (MF(B)_{D1}) pomocí čerpadla ve dvourozměrné kapalinové chromatografii. V ovládacím programu byl gradient pro první dimenzi nastaven podle Tabulky 6.

Tabulka 6: Průběh gradientu mobilní fáze v první dimenzi.

Čas separace [min]	c MF(B)D1 [%]	c MF(A)D1 [%]
0,0	98	2
20,0	85	15
60,0	75	25
66,7	55	45
100,0	55	45

Změna koncentrace roztoku acetonitrilu s octanem amonným během celé separace je znázorněna na Obrázku 27 (modrá křivka).



Obrázek 27: Průběh gradientů mobilních fází v první (modrá křivka) a ve druhé (oranžová křivka) dimenzi.

Ve druhé dimenzi byl použit plný gradient mobilní fáze MF(A)_{D2} a MF(B)_{D2}. Jedna separace (modulační čas) ve druhé dimenzi probíhala po dobu 1 minuty. Gradient byl nastaven od 0 minuty do 0,7 minuty separace. V čase separace 0,72 min byla koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi nastavena na počáteční podmínky, aby se kolona před další separací promyla počáteční mobilní fází (ekvilibrovala). Byly vybrány 4 typy gradientů mobilní fáze pro druhou dimenzi se zachováním rozsahu, které jsou následující: 0–40 %, 10–50 %, 20–60 % a 30–70 % acetonitrilu v mobilní fázi. Na Obrázku 27 (oranžová křivka) je znázorněn příklad plného gradientu o koncentraci MF(B)_{D2} od 10 % v 0 minutě do 50 % v 0,7 minutě separace, který je uveden v Tabulce 7.

Tabulka 7: Změna koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi ve druhé dimenzi během jedné separace.

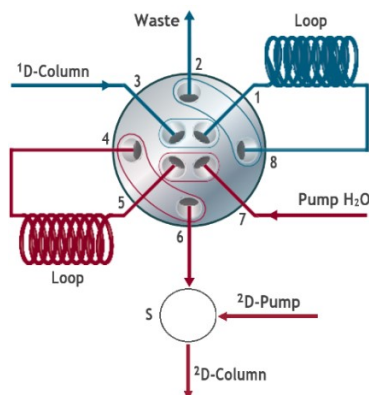
Čas separace [min]	$CMF(B)_{D2}$ [%]	$CMF(A)_{D2}$ [%]
0,00	10	90
0,70	50	50
0,72	10	90
1,00	10	90

2.3.3 Podmínky při zapojení modulace ředěním na koloně

Modulace ředěním na koloně byla složena z duo čtyřcestného dvoupolohového ventilu, dvou zachytávacích smyček a směšovače toku ve tvaru T. Pro přívod MF(A)_{D2} bylo připojeno další čerpadlo s odplynovačem mobilní fáze. Princip je popsán v kapitole 1.8.3.4.

Do jednotlivých portů duo čtyřcestného dvoupolohového ventilu byly zapojeny: přítok z první dimenze, dvě zachytávací smyčky o objemu 20 μ l, odpad, odtok do druhé dimenze a přívod MF(A)_{D2} (Obrázek 28).

Frakce v trapovací smyčce byla na druhou kolonu vymývána pomocí přídatného toku MF(A)_{D2}, který byl čerpán externím čerpadlem o průtoku 0,5 ml/min. Frakce se s mobilní fází smíchala až ve směšovači toku S (Obrázek 28) a směs pokračovala na druhou kolonu, kde došlo k separaci látek. Průtok ve druhé dimenzi v řídicím programu byl nastaven na 3,0 ml/min. Celkový průtok mobilní fáze na koloně druhé dimenze byl tedy 3,5 ml/min. Ventil se přepínal v pravidelných cyklech po 60 sekundách.



Obrázek 28: Modulace ředěním na koloně (upraveno z [2]).

Protože se zachytávací smyčka vymývala MF(A)_{D2}, bylo potřeba nastavit gradient acetonitrilu ve druhé dimenzi v řídicím programu trochu jinak než při použití duo čtyřcestného dvoupolohového ventilu nebo třismyčkového modulátoru. Koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi ve druhé dimenzi byla nastavena na vyšší hodnotu, aby byl zachován rozsah gradientu jako v případě použití modulátoru bez ředění (0–40 %, 10–50, 20–60 % a 30–70 % ACN). V Tabulce 8 je uvedeno nastavení gradientu v řídicím programu pro výslednou koncentraci 10–50 % MF(A)_{D2}. Výpočet těchto vyšších koncentrací acetonitrilu byl proveden podle Rovnice 6:

$$c_1 \times F_{m1} + c_2 \times F_{m2} = c \times F_m \quad (6)$$

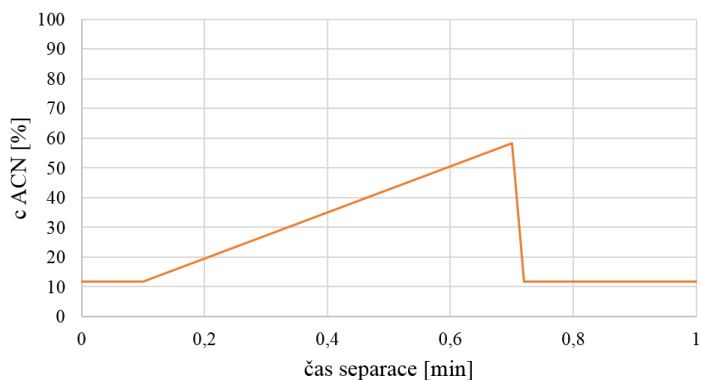
kde c_1 je koncentrace acetonitrilu ve vodě [%], F_{m1} značí průtok MF(A)_{D2} před smícháním s mobilní fází [ml/min], c_2 odpovídá koncentraci acetonitrilu v mobilní fázi [%], F_{m2} je průtok mobilní fáze [ml/min] před smícháním s vodou, c znamená výsledná koncentrace acetonitrilu [%] v mobilní fázi a F_m odpovídá průtoku [ml/min] po smíchání s MF(A)_{D2}.

Tabulka 8: Příklad nastavení gradientu acetonitrilu v rozsahu od 10 do 50 % v mobilní fázi pro druhou dimenzi při zapojení modulace ředěním na koloně.

Čas separace [min]	$c_{MF(B)D2}$ [%]	$c_{MF(A)D2}$ [%]
0,00	11,7	88,3
0,10	11,7	88,3
0,70	58,3	41,7
0,72	11,7	88,3
1,00	11,7	88,3

Opět jedna separace ve druhé dimenzi probíhala po dobu 1 minuty. Na počátku gradientu probíhala od 0 do 0,1 minuty izokratická eluce a od 0,1 do 0,7 minuty separace ve druhé dimenzi probíhala gradientová eluce. Po zbytek času, než došlo k přepnutí duo čtyřcestného dvoupolohového ventilu do druhé pozice, byl gradient nastaven na počáteční podmínky, aby se kolona ve druhé dimenzi ekvilibrovala.

Příklad nastavení gradientu při separaci ve druhé dimenzi, jehož koncentrace v mobilní fázi byla od 10 % v 0,1 minuty do 50 % acetonitrilu v mobilní fázi v 0,7 minuty separace, je graficky znázorněn na Obrázku 29.



Obrázek 29: Gradient acetonitrilu v mobilní fázi druhé dimenze při použití modulace ředěním na koloně.

2.4 Pracovní postupy

2.4.1 Příprava 10 mM roztoku octanu amonného ve vodě

Příprava 10 mM octanu amonného ve vodě pufrovaného kyselinou mravenčí na pH 3,1 byla provedena tak, že na lodičku bylo naváženo 0,7708 g octanu amonného. Do baňky o objemu 1 l bylo nalito asi 800 ml ultračisté vody. Octan amonný byl kvantitativně převeden do odměrné baňky. Dále bylo měřeno pH roztoku pomocí pH-metru a byla přidávána kyselina mravenčí, dokud pH roztoku nemělo hodnotu 3,1. Hodnota pH 3,1 odpovídá přídavku objemu 2,1 ml kyseliny mravenčí. Proto při každé přípravě tohoto roztoku už nebylo měřeno pH, ale rovnou bylo přidáno 2,1 ml kyseliny mravenčí. Baňka byla doplněna po rysku ultračistou vodou. Roztok byl promíchán a zfiltrován přes filtr s velikostí pórů 0,45 μm .

2.4.2 Příprava 10 mM octanu amonného v acetonitrilu

Mobilní fáze 10 mM octanu amonného v acetonitrilu byla připravena rozpuštěním 0,3854 g octanu amonného v 0,5 l acetonitrilu. Látka byla v acetonitrilu velmi špatně rozpustná, proto zásobní lahev s roztokem byla umístěna do ultrazvukové lázně po dobu 1 hodiny, přičemž bylo roztokem občas zamícháno. Následně byl roztok přefiltrován přes filtr pro organická rozpouštědla o velikosti pórů 0,45 μm .

2.4.3 Příprava standardů fenolických kyselin

Modelové vzorky byly připraveny z fenolických kyselin (Tabulka 4). Ze standardních látek fenolických kyselin (FK) byla připravena zásobní směs, kdy od každé kyseliny bylo naváženo cca 10 mg. Zásobní směs ve vialce byla zhomogenizována na Vortexu. Následně z této směsi byl připraven pracovní roztok tak, že bylo naváženo 5 mg směsi FK do vialky a tato navážka byla rozpuštěna v 1 ml methanolu. Pro lepší rozpuštění byla vialka umístěna na 2 minuty do ultrazvukové lázně. Takto připravené zásobní i pracovní vzorky byly uchovávány v lednici při 5 °C v tmavých vialkách uzavřených septem.

Roztok obsahující kyselinu protokatechuovou a kyselinu *p*-kumarovou byl připraven následujícím způsobem. Do vialky bylo naváženo 10 mg od každé sloučeniny a rozpuštěno v 10 ml methanolu. Tento roztok byl 100× naředěn, tedy 0,1 ml vzorku byl smíchán s 10 ml methanolu. Roztok byl uchováván v chladu v tmavé vialce.

Roztok kyseliny protokatechuové a kyseliny *p*-kumarové ve 20% methanolu, byl připraven tak, že bylo naváženo cca 1 mg od každé kyseliny do tmavé vialky. Navážka byla rozpuštěna ve směsi 8 ml vody a 2 ml methanolu. Pro lepší rozpuštění byl roztok ponořen na 2 minuty do ultrazvukové lázně. Roztok byl uchováván v chladu.

2.5 Experimentální zpracování dat

Experimentální data byla získána pomocí programu Agilent OpenLab ChemStation od firmy Agilent Technologies (Santa Clara, USA) a následně zpracována do konturových chromatogramů, které byly sestrojeny v programu Eval 2Dverze 2.71Lite (doc. Ing. Petr Česla, Ph.D., Univerzita Pardubice). Kapilární elektroforesa byla ovládána pomocí ovládacího softwaru Agilent OpenLab ChemStation od firmy Agilent Technologies (Santa Clara, USA). Výpočty byly provedeny v Microsoft Excel 2016 (Microsoft, Redmond, USA). Diplomová práce byla sepsána v Microsoft Word 2016 (Microsoft, Redmond, USA).

3 Výsledky a diskuze

Cílem diplomové práce bylo porovnat vliv různých typů modulátorů pro dvoudimenzionální kapalinovou chromatografii opatřených buď zachytávacími smyčkami nebo kolonkami, a plných gradientů s různými rozsahy organické fáze na šířku a výšku píků ve druhé dimenzi. Pro otestování těchto vlivů byl zvolen HILIC×RP separační systém, u kterého je převod frakcí velice náchylný na rozmývání a štěpení píků. K separaci v první dimenzi byla využita kapilární zwitteriontová methakrylátová monolitická kolona [44], která umožňuje separaci v módu chromatografie hydrofilních interakcí. Pro separaci v reverzní fázi byla použita komerčně dostupná kolona Chromolith HighResolution s monolitickou oktadecyl-silikagelovou stacionární fází. Separační systém HILIC×RP je vhodný pro separaci fenolických kyselin i dalších polyfenolů [45].

Mobilní fáze v první dimenzi byla složena z 10 mM roztoku octanu amonného v acetonitrilu a 10 mM roztoku octanu amonného ve vodě pufovaného kyselinou mravenčí na pH 3,1. Pro druhou dimenzi byl využit čistý acetonitril a 10 mM octan amonný ve vodě pufovaný kyselinou mravenčí o pH 3,1.

Byly testovány 3 druhy rozhraní: třísmyčkový modulátor se třemi zachytávacími smyčkami nebo kolonkami (TSM), modulace ředěním na koloně (ACD) se dvěma zachytávacími smyčkami a duo čtyřcestný dvoupolohový ventil (AG). Duo čtyřcestný dvoupolohový ventil byl opatřen dvěma zachytávacími smyčkami nebo kolonkami s různými stacionárními fázemi a velikostmi. Trapovací kolonky byly naplněny oktadecyl-silikagelovou stacionární fází (C18) nebo silikagelem, který umožňuje použít kolonky v HILIC režimu. Pro snazší orientaci jsou dále používány zkratky modulátorů (AG, TSM, ACD) spolu s typem zapojení zachytávacího zařízení (smyčky, trapHILIC, trapC18-5, trapC18-20).

Testovací směsí látek byly standardy fenolických kyselin. Hodnocení vlivu různých typů modulátorů a plných gradientů na rozmývání píků ve druhé dimenzi bylo provedeno na základě průměrné šířky píku při základně, ze které následně byla spočítána píková kapacita podle Rovnice 1 (viz kapitola 2.3.1). Průměrné šířky píků

byly určeny z několika desítek píků v rámci jedné separace, které měly tvar Gaussovy křivky a nebyly rozštěpené (průměrně 30 píků).

Pro každý modulátor byla spočítána zvlášť strmost gradientu ve druhé dimenzi podle Rovnice 3, protože průtoky ve druhé dimenzi nebyly u všech zapojených typů modulátorů stejné. Vždy byl nastaven nejvyšší možný průtok s ohledem na tlakové limity samotné chromatografické kolony ve druhé dimenzi (200 bar), neboť každý modulátor, ať už se zachytávacími smyčkami nebo kolonkami, do systému přinesl odlišný odpor. Cílem byla vždy nejrychlejší separace ve druhé dimenzi.

3.1 Vliv počáteční koncentrace gradientu ve druhé dimenzi

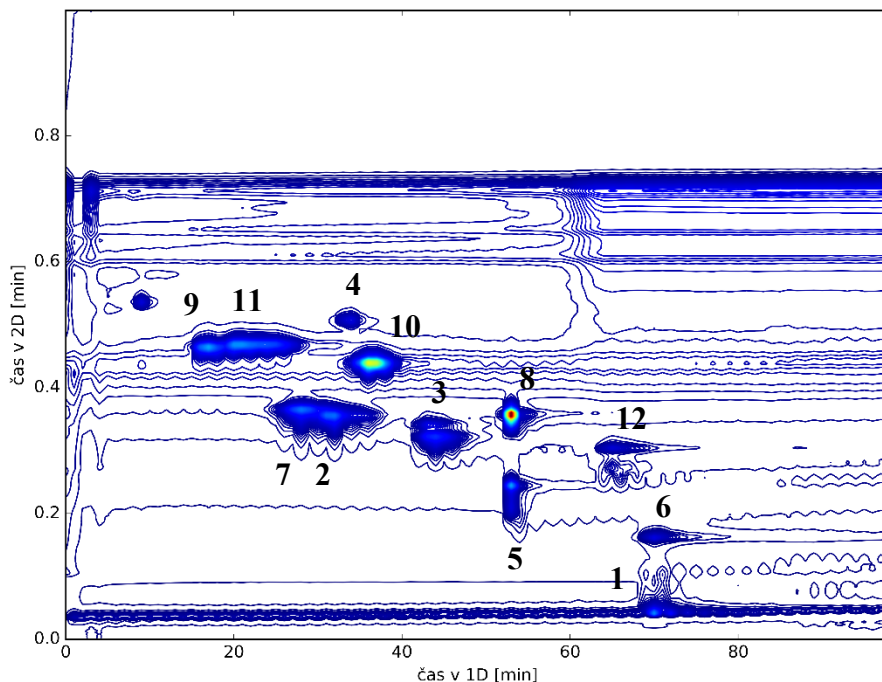
V systému HILIC×RP je mobilní fáze první dimenze rozpouštědlem s velmi silnou eluční silou oproti mobilní fázi ve druhé dimenzi. Je proto důležité převádět pouze frakce o malém objemu, aby nedošlo k přílišnému rozmývání nebo štěpení píků [46]. Významnou úlohu bude mít i počáteční koncentrace gradientu ve druhé dimenzi, neboť může pomoci naředit silné eluční činidlo ještě před vstupem frakce na kolonu druhé dimenze. Z tohoto důvodu byly testovány různé počáteční koncentrace acetonitrilu (0, 10, 20 a 30 %) v gradientech druhé dimenze. Aby se na šířce píku projevila pouze počáteční koncentrace, a nikoliv i rozdílná strmost gradientu, byl použit vždy rozsah gradientu 40 %, tedy gradienty 0–40 %, 10–50 %, 20–60 %, 30–70 % ACN v mobilní fázi pro druhou dimenzi (MF(B)_{D2}).

3.1.1 Duo čtyřcestný dvoupolohový ventil

3.1.1.1 Zachytávací smyčky

Nejvíce využívaným a nejjednodušším modulátorem ve dvourozměrné kapalinové chromatografii je duo čtyřcestný dvoupolohový ventil se zachytávacími smyčkami. Tento ventil byl již představen v kapitole 1.8.1. Použité zachytávací smyčky měly objem 20 μ l. Dvousmyčkový modulátor umožnil nastavit průtok ve druhé dimenzi až na 3,5 ml/min. Po separaci byla spočítána píková kapacita podle Rovnice 1, jejíž výsledky jsou uvedeny v Tabulce 9. Zároveň byla vyhodnocena i výška píku kyseliny sinapové a spočítán odstup signálu od šumu podle

Rovnice 5. Ukázkový chromatogram je na Obrázek 30 a další jsou uvedeny v Příloze 1.



Obrázek 30: 2D chromatogram fenolických kyselin s gradientem 0–40 % acetonitrilu v mobilní fázi pro druhou dimenzi a s modulátorem AG-smyčky. Čísla látek odpovídají Tabulce 4.

Z konturového chromatogramu (Obrázek 30) bylo patrné, že u některých píků ve druhé dimenzi docházelo k rozmytí čela (frontování). Nejvíce frontující pík byl u kyseliny 4-hydroxyfenyloctové (7), kyseliny protokatechuové (2) a kyseliny vanilové (5). Při gradientech 0–40 % a také při 10–50 % ACN došlo k separaci prakticky všech testovaných látek. Při vyšší počáteční koncentraci acetonitrilu v mobilní fázi (20 a 30 %) docházelo ke smývání píků, které se eluovaly čím dál blíže k mrtvému objemu kolony a identifikace píků tak byla velmi obtížná (Příloha 1, Obrázek P1.2 a P1.3).

Tabulka 9: Výsledky separace při použití duo čtyřcestného dvoupolohového ventilu se dvěma zachytávacími smyčkami.

c_{ACN} [%]	$w_{h/2}$ [min]	w [min]	$h_{kys. \text{ sinapové}}$ [mAU]	S/N	n_p
0–40	0,0184	0,0313	135,6	1316,2	23,3
10–50	0,0199	0,0337	89,1	864,9	24,8
20–60	0,0219	0,0372	64,9	629,9	19,8
30–70	0,0204	0,0346	90,8	881,4	21,2

Duo čtyřcestný dvoupolohový ventil se dvěma zachytávacími smyčkami a nastaveným gradientem od 10 % do 50 % acetonitrilu v mobilní fázi poskytoval nejvyšší píkovou kapacitu (24,8) ze všech separací s AG-smyčky. Spolu se zvyšující se počáteční koncentrací acetonitrilu v mobilní fázi klesala píkova kapacita. Výjimku v tomto trendu představovala separace s počáteční koncentrací ACN 30 %, kdy došlo ke zvýšení píkové kapacity oproti separaci s 20–60 % organické fáze. Vzrůst píkové kapacity byl nejpravděpodobněji způsoben tím, že píky se eluovaly v blízkosti mrtvého objemu kolony a byly značně smyté. Platí, že s rostoucí koncentrací acetonitrilu na počátku gradientu se píky více deformují.

Největší výšky píku kyseliny sinapové bylo dosaženo při koncentraci acetonitrilu v mobilní fázi 0–40 %, a tudíž odstup signálu od šumu je největší. Hodnoty poměru S/N by měly korelovat s píkovou kapacitou. V tomto případě tomu tak nebylo, což mohlo být způsobeno posunem retenčního času eluce kyseliny sinapové na koloně v první dimenzi a časem vzorkování. Nejnižší hodnoty S/N bylo dosaženo při koncentraci 20–60 % acetonitrilu.

3.1.1.2 Zachytávací kolonky

Jak bylo uvedeno v teoretické části diplomové práce (kapitola 1.8), místo smyček lze na duo čtyřcestný dvoupolohový ventil zapojit kolonky s různou stacionární fází a s různými rozměry. Kolonky umožňují zachycení analytů na jejím začátku, a tím frakci zakoncentrují do úzké zóny.

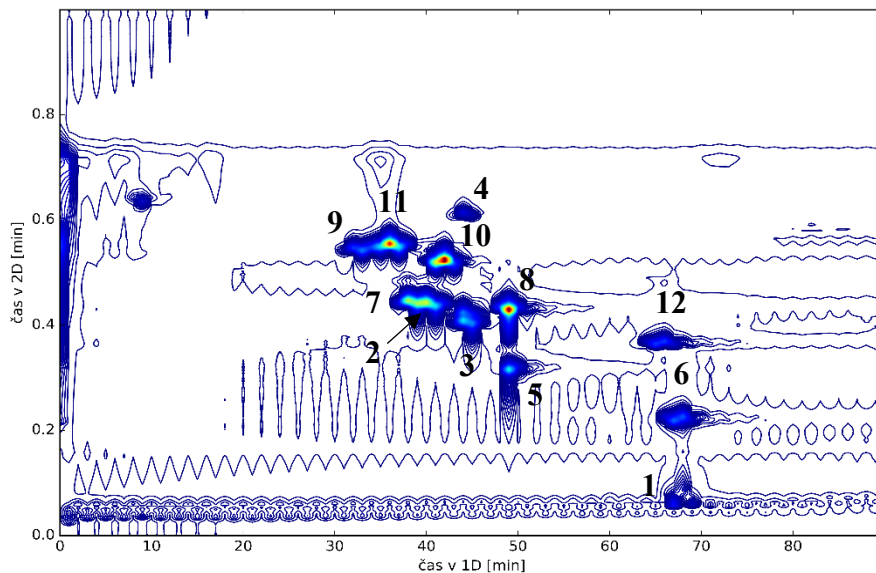
Protože v první dimenzi byla separace provedena v HILIC režimu a ve druhé dimenzi byla použita C18 stacionární fáze, byly obě tyto stacionární fáze vyzkoušeny i v trapovacích kolonkách.

Zakoncentrování frakce závisí na tom, v jakém směru bude kolonka vymývána, proto bylo testováno zapojení jak po směru, tak v protisměru plnění. Kolonky zapojené po směru se vymývaly mobilní fází druhé dimenze po směru plnění eluátem z první dimenze, kdežto kolonky zapojené do protisměru se vymývaly v opačném směru, než probíhalo plnění.

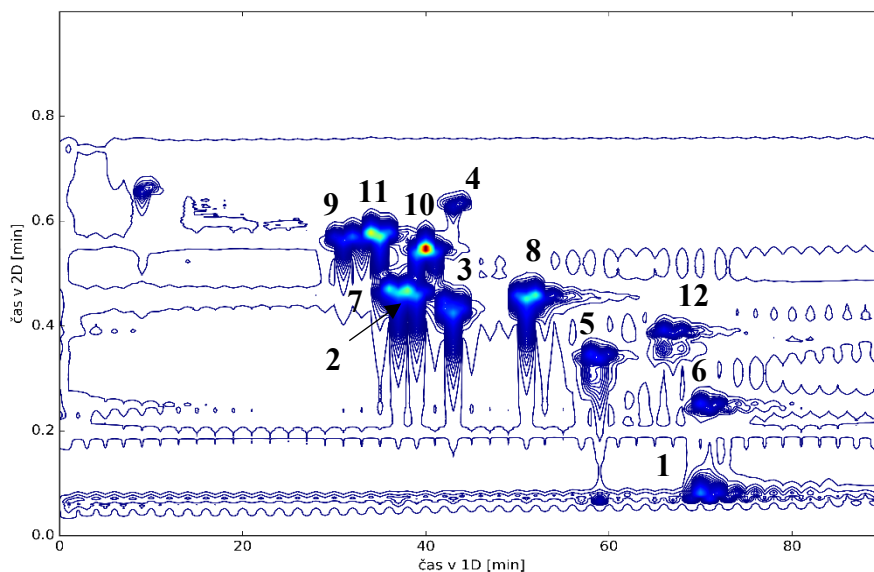
Zachycení frakcí bylo provedeno na kolonkách o různých velikostech: 5×2,1 mm (délka×vnitřní průměr) s velikostí částic 3 μm a o celkovém vnitřním objemu 20 μl, které byly naplněny buď oktadecyl-silikagelovou stacionární fází (C18), nebo silikagelem, a 20×4 mm naplněné C18 stacionární fází s velikostí částic 5 μm a celkovým vnitřním objemem 251 μl.

Trapovací kolonky přinesly do systému větší odpor než zachytávací smyčky, a tudíž vzrostl i tlak na koloně ve druhé dimenzi. Proto musel být průtok mobilní fáze ve druhé dimenzi snížen na 2 ml/min při zapojení kratších a užších kolonek (AG-trapHILIC a AG-trapC18-5). Větší vnitřní průměry a délky kolonek C18 o délce 20 mm (AG-trapC18-20) přinášely do systému menší tlakový odpor a průtok mobilní fáze mohl být v tomto případě nastaven na 2,4 ml/min.

U 2D chromatogramů rozseparovaných fenolických kyselin při FIF 0–40 % ACN a se zapojenými kolonkami po směru jsou znázorněné na Obrázcích 31, 33 a 35. Konturové chromatogramy získané při zapojení kolonek do protisměru jsou na Obrázcích 32, 34 a 36. Další 2D chromatogramy jsou umístěny v Příloze 2 (AG-trapHILIC), Příloze 3 (AG-trapC18-5) a Příloze 4 (AG-trapC18-20). Vyhodnocení separací z pohledu píkových kapacit a odstupu signálu od šumu je uvedeno v Tabulce 10.

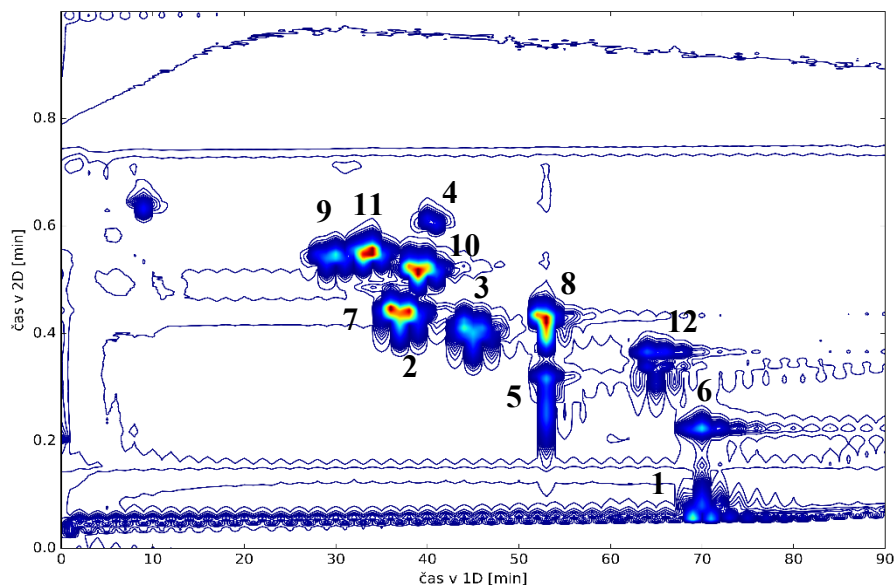


Obrázek 31: 2D chromatogram fenolických kyselin při zapojení AG-trapHILIC po směru a s gradientem 0–40 % ACN ve druhé dimenzi. Číslo identifikovaných píků odpovídají Tabulce 4.

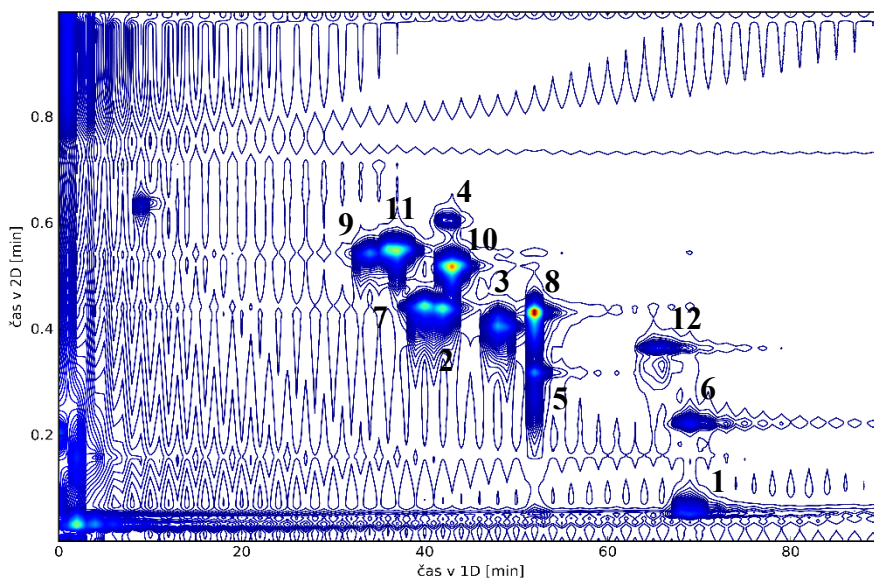


Obrázek 32: 2D chromatogram fenolických kyselin při gradientu 0–40 % ACN a zapojení AG-trapHILIC v protisměru. Číslo píků v záznamu jsou uvedena v Tabulce 4.

Zapojené HILIC kolonky po směru (Obrázek 31) přinesly více píků, které frontovaly (sloučeniny 7, 2, 3, 8 a 5), než při separaci s duo čtyřcestným dvoupolohovým ventilem se smyčkami. Při zapojení HILIC kolonek do protisměru měly píky ve 2D chromatogramu (Obrázek 32) výrazně více rozmytá čela než při zapojení HILIC kolonek po směru. Tento jev byl patrný již z UV/VIS záznamů ještě před zpracováním do konturových chromatogramů.



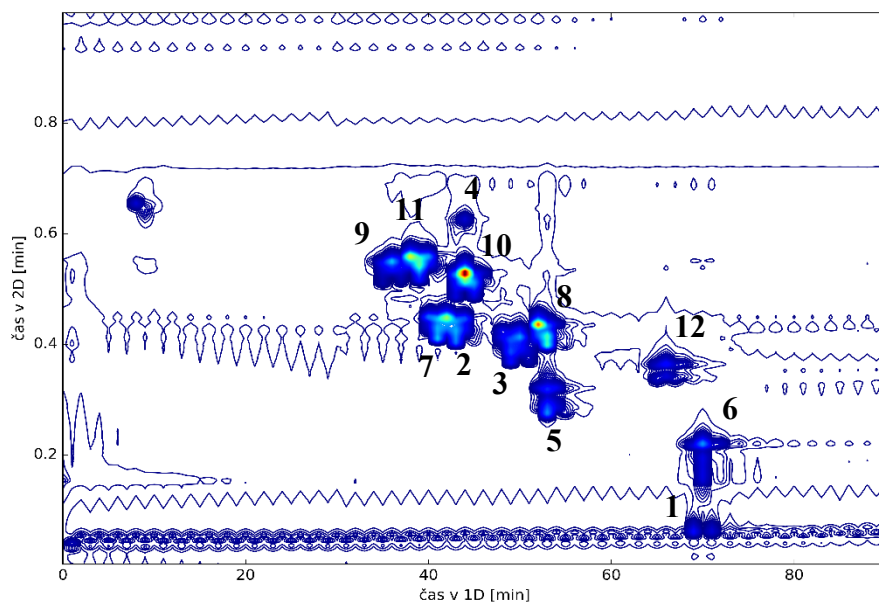
Obrázek 33: Separace fenolických kyselin při zapojení AG-trapC18-5 po směru a s gradientem MF(B)_{D2} 0–40 %. Identifikované píky se shodují s čísly v Tabulce 4.



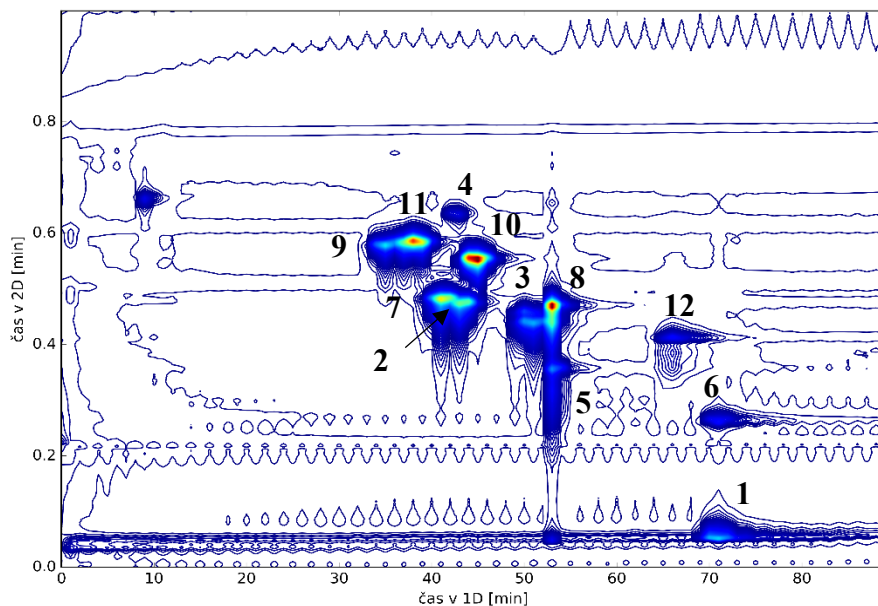
Obrázek 34: 2D chromatogram fenolických kyselin při zapojení AG-trapC18-5 v protisměru a s gradientem acetonitrilu 0–40 % v mobilní fázi. Číslo píků odpovídají číslům kyselin v Tabulce 4.

Kolonky C18-5 připojené k duo čtyřcestnému dvoupolohovému ventilu v protisměru poskytly píky, které byly méně rozmyté (užší) oproti separaci s HILIC kolonkami také zapojené v protisměru. 2D chromatogramy při zapojení AG-trapHILIC a AG-trapC18-5 po směru vypadaly velmi podobně. Ani kolonky C18-5 zapojené po směru neposkytly menší rozmytí čela píků než zachytávací

smyčky na AG ventilu. Porovnání 2D chromatogramů získaných při zapojení kolonek C18-5 po směru nebo v protisměru ukazuje, že pokud byla frakce z kolonky vymývána v opačném směru než probíhalo plnění, tak píky více frontovaly oproti píků získaných při zapojení kolonek po směru.



Obrázek 35: 2D chromatogram fenolických kyselin při zapojení AG-trapC18-20 po směru. Nastavení gradientu acetonitrilu bylo od 0 do 40 %. Číslo píků jsou uvedena v Tabulce 4.



Obrázek 36: 2D chromatogram fenolických kyselin s nastaveným gradientem 0–40 % ACN a při zapojení AG-trapC18-20 v protisměru. Význam čísel u identifikovaných píků je uveden v Tabulce 4.

Zachytávací kolonky C18 s větší délkou (20 mm) a větším vnitřním průměrem (4 mm) poskytovaly nejužší píky ze všech testovaných kolonek. Záznam separace s C18-20 kolonkami zapojenými po směru byl z pohledu rozmývání čela píků srovnatelný s AG modulátorem se smyčkami. Naproti tomu kolonky C18-20 v protisměru poskytly píky, které mají výrazně rozmyté čelo (nejvíce patrné u píků kyseliny vanilové (5) a kávové (8)).

Tabulka 10: Výsledky při zapojení duo čtyřcestného dvoupolohového ventilu se dvěma trapovacími HILIC kolonkami, C18-5 kolonkami nebo C18-20 kolonkami.

Druh zapojení	c_{ACN} [%]	$w_{h/2}$ [min]	w [min]	$h_{kys. \text{ sinapové}}$ [mAU]	S/N	n_p
HILIC, 5×2,1 mm (AG-trapHILIC), $F_m = 2,0$ ml/min						
Zapojení po směru	0–40	0,0182	0,0309	204,4	1984,1	23,6
	10–50	0,0251	0,0427	150,9	1464,8	17,4
	20–60	0,0304	0,0517	111,4	1081,3	14,5
	30–70	0,0335	0,0569	98,4	955,2	13,3
Zapojení v protisměru	0–40	0,0229	0,0389	159,1	1544,4	18,9
	10–50	0,0276	0,0469	93,8	910,5	15,9
	20–60	0,0340	0,0579	98,4	955,2	13,1
	30–70	0,0329	0,0559	74,0	718,3	13,5
C18, 5×2,1 mm (AG-trapC18-5), $F_m = 2,0$ ml/min						
Zapojení po směru	0–40	0,0261	0,0445	159,6	1549,2	16,7
	10–50	0,0315	0,0536	126,3	1225,9	14,1
	20–60	0,0319	0,0542	132,0	1281,3	13,9
	30–70	0,0343	0,0583	157,8	1531,7	13,0
Zapojení v protisměru	0–40	0,0241	0,0410	169,1	1641,4	18,1
	10–50	0,0279	0,0475	84,6	821,2	15,7
	20–60	0,0346	0,0587	96,7	938,7	12,9
	30–70	0,0336	0,0571	73,8	716,4	13,3
C18, 20×4 mm (AG-trapC18-20), $F_m = 2,4$ ml/min						
Zapojení po směru	0–40	0,0191	0,0325	228,4	2217,0	22,6
	10–50	0,0221	0,0375	122,5	1186,1	19,7
	20–60	0,0242	0,0411	75,3	730,9	18,0
	30–70	0,0219	0,0372	106,2	1030,9	19,8
Zapojení v protisměru	0–40	0,0219	0,0372	171,7	1666,7	19,8
	10–50	0,0251	0,0426	94,5	917,3	17,4
	20–60	0,0300	0,0510	76,5	742,6	14,7
	30–70	0,0303	0,0516	97,7	948,4	14,6

Píková kapacita druhé dimenze dosažená modulátory se zachytávacími kolonkami byla obecně menší než u duo čtyřcestného dvoupolohového ventilu se dvěma zachytávacími smyčkami (Tabulka 10), průměrně 15,7 (protisměr), respektive 17,2 (po směru). Nejvyšší píková kapacita druhé dimenze pro HILIC kolonky byla při zapojení po směru vymývání a při gradientu 0 až 40 % acetonitrilu v mobilní fázi a byla to také nejvyšší píková kapacita ze všech zapojených trapovacích kolonek. Čím vyšší byla počáteční koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi, tím píková kapacita u tohoto modulátoru výrazně klesala. Nejvyšších píkových kapacit i při zvyšování počáteční koncentrace bylo dosaženo při zapojení duo čtyřcestného dvoupolohového ventilu s C18 kolonkami o délce 20 mm (AG-trapC18-20) zapojenými po směru, které umožnily zvýšit průtok ve druhé dimenzi na 2,4 ml/min. Při zapojení v protisměru poklesly píkové kapacity zhruba o 13 % (3 píky) než při zapojení po směru. U tohoto typu modulátoru a při koncentraci 0–40 % acetonitrilu bylo dosaženo také největšího odstupů signálu od šumu.

Při gradientu 0–40 % ACN bylo nejhorších píkových kapacit dosaženo na kolonkách s C18 stacionární fází o délce 5 mm, a to jak při zapojení po směru (16,7), tak v protisměru (18,1). Z toho vyplývá, že použitím delších a širších C18 kolonek zapojených po směru vedlo ke zvýšení píkové kapacity asi o 6 píků.

Při porovnání vlivu velikosti kolonky C18 na výšku píku kyseliny sinapové, a tedy odstup signálu od šumu, bylo zřejmé, že použití delších kolonek se získala větší výška píku i při vyšších koncentracích acetonitrilu v mobilní fázi. Rozdíl mezi výškou píku při zapojení C18-5 a C18-20 kolonek činí 30 %.

Obecně lze konstatovat, že zapojení kolonek v protisměrném uspořádání přineslo menší píkovou kapacitu druhé dimenze a více frontujících píků (Obrázek 32, 34 a 36) než při zapojení kolonek po směru. Důvodem mohlo být zředění až vymytí rozpouštědla ve frakci při průchodu zachytávací kolonkou, a proto se látky dostaly na kolonu druhé dimenze již v počáteční koncentraci ACN. Na druhou stranu při protisměrném uspořádání byly látky vymyty v úzké zóně na začátku zachytávací kolonky tak, jak byly zachyceny.

Z Tabulky 10 dále vyplynulo, že druh stacionární fáze v zachytávacích kolonkách zřejmě nemá velký vliv na píkovou kapacitu, pokud byly kolonky HILIC

a C18-5 zapojené v protisměru. Zajímavé ale je, že když se tyto kolonky zapojily po směru a použil se gradient 0–40 %, píková kapacita druhé dimenze u HILIC kolonek byla o 29 % větší než u kolonek C18-5. Rozdíl je způsoben tím, že kolonky HILIC byly vymývány silným elučním rozpouštědlem a zachycené analyty se ihned eluovaly na druhou kolonu, kdežto ve stacionární fázi C18 se analyty déle zadržely. Při zvyšující se koncentraci acetonitrilu v mobilní fázi rozdíl v píkové kapacitě u kolonek HILIC a C18 klesal (u počáteční koncentrace 10 % ACN byl pík vyšší již pouze o 19 %), protože při zvyšující se koncentraci acetonitrilu v mobilní fázi byla frakce méně naředěná vodnou fází.

Nejvyšší píková kapacita byla u většiny modulátorů dosažena při jejich zapojení po směru a při počáteční koncentraci acetonitrilu 0 % v mobilní fázi. Tento trend nebyl patrný u AG-trap C18-5, kdy bylo dosaženo vyšší píkové kapacity při zapojení do protisměru než po směru. Nejnižších píkových kapacit bylo dosaženo při počáteční koncentraci 30 % acetonitrilu v mobilní fázi u všech kolonek ať už zapojených po směru nebo v protisměru. Při této koncentraci se sloučeniny eluovaly na začátku průběhu gradientu poměrně blízko mrtvého objemu kolony.

Hodnota *S/N* klesala s tím, jak klesala píková kapacita. Opět lze říci, že vyjma kolonek C18-5 se získaly vyšší hodnoty *S/N* při zapojení kolonek po směru. Kratší kolonky C18 zapojené v protisměru poskytly vyšší výšku píku kyseliny sinapové (169,1 mAU) než při zapojení po směru (159,6 mAU). Výška píku mohla být ovlivněna posunem retenčního času na koloně první dimenze a vzorkováním.

3.1.2 Modulace ředěním na koloně

Zvýšit píkovou kapacitu umožňují aktivní modulátory, které zakoncentrovávají frakci před druhou separací nebo umožňují ředění mobilní fáze z první dimenze. Mezi tyto aktivní modulátory se řadí i modulace ředěním na koloně, jejíž vliv na rozmývání píků ve druhé dimenzi byl testován.

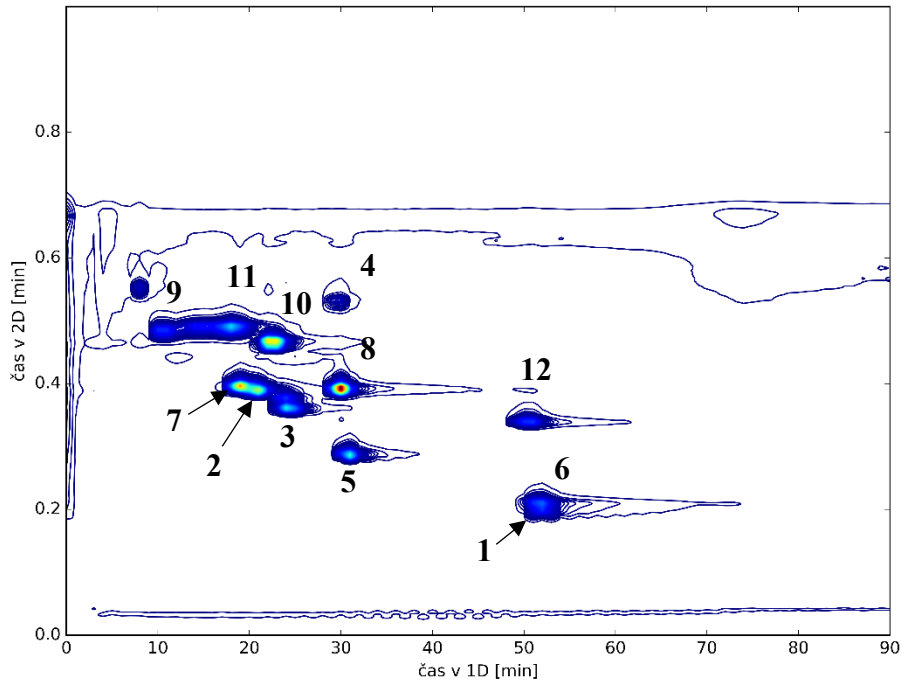
Modulátor byl složen z duo čtyřcestného dvoupolohového ventilu, dvou zachytávacích smyček a směšovače toku, který byl mezi ventilem a kolonou ve druhé

dimenzi. Propojení jednotlivých částí modulátoru je popsáno v experimentální části v kapitole 2.3.3 a princip fungování je uveden v kapitole 1.8.3.4.

Celkový průtok ve druhé dimenzi byl nastaven na 3,5 ml/min, ale k čerpání toku mobilní fáze sloužily dvě čerpadla. Jedno čerpadlo dodávalo stálý průtok mobilní fáze MF(A)_{D2} 0,5 ml/min do ventilu a zajišťovalo vymývání smyček. Druhé čerpadlo s průtokem 3 ml/min umožňovalo gradient mobilní fáze ve druhé dimenzi. Oba toky se spojily ve směšovači před kolonou ve druhé dimenzi. Zachytávací smyčky tak byly vymývány pufovanou vodnou fází s nízkou eluční silou a naředila se mobilní fáze z první dimenze s vysokým obsahem organické fáze.

Gradient ve druhé dimenzi musel být přepočítán, aby byla zachována počáteční koncentrace a rozsah gradientu jako u AG modulátoru. Nastavení gradientu v řídicím programu je uvedeno v kapitole 2.3.3.

Ze získaných dat byly sestrojeny 2D chromatogramy, které jsou znázorněny na Obrázku 37 a v Příloze 5. Vyhodnocení píkových kapacit je uvedeno v Tabulce 11.



Obrázek 37: 2D chromatogram fenolických kyselin při zapojení ACD a při nastaveném gradientu 0–40 % acetonitrilu v mobilní fázi pro druhou dimenzi. Čísla píků se shodují s čísly sloučenin v Tabulce 4.

Píky ve 2D chromatografu získaného při zapojení modulace ředěním na koloně nebyly rozmyté, nechvostovaly ani nefrontovaly, což bylo výrazné zlepšení oproti zapojenému duo čtyřcestnému dvoupolohovému ventilu s trapovacími kolonkami. Také měly lepší tvar a nefrontovaly jako při použití zachytávacích smyček (Obrázek 30).

Tabulka 11: Výsledky separace při zapojení modulace ředěním na koloně.

c_{ACN} [%]	$w_{h/2}$ [min]	w [min]	$h_{kys. \text{ sinapová}}$ [mAU]	S/N	n_p
0–40	0,0147	0,0249	192,1	1864,7	29,0
10–50	0,0185	0,0314	185,1	1796,7	23,3
20–60	0,0308	0,0504	86,4	838,7	14,9
30–70	0,0269	0,0457	98,3	954,2	16,3

Jak je patrné z Obrázku 37 i z Tabulky 11, modulace ředěním na koloně je velmi účinnou metodou na snížení rozmytí píků ve druhé dimenzi. Při počáteční koncentraci acetonitrilu v mobilní fázi 0 % bylo dosaženo nejvyšší píkové kapacity (29,0) v porovnání s duo čtyřcestným dvoupolohovým ventilem se zachytávacími smyčkami nebo kolonkami. Píková kapacita se zvýšila cca o 14 % oproti píkové kapacitě, která byla získána při zapojení AG-smyčky. Na druhou stranu při zvyšování počáteční koncentrace acetonitrilu (10 nebo 20 % ACN), píková kapacita výrazně klesala až o 49 % při koncentraci acetonitrilu 20 %, a to i pod hodnoty píkových kapacit získaných při použití pouze zachytávacích smyček nebo kolonek bez ACD modulace. Píková kapacita při gradientu 0–40 % byla sice nejvyšší, ale odstup signálu od šumu už nejvyšší nebyl, byl menší o 16 % oproti nejvyšší hodnotě S/N při zapojení AG-trapC18-20 po směru (2217,0).

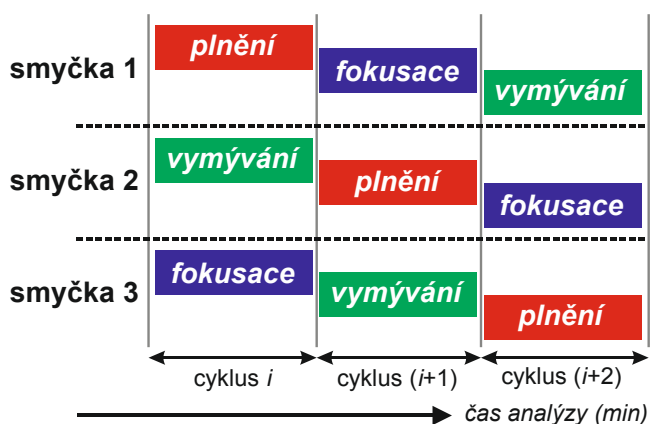
Odstup signálu od šumu byl nejvyšší při počáteční koncentraci acetonitrilu 0 %. Tato hodnota byla nižší o 16 % oproti hodnotě S/N , která byla dosažena při zapojení kolonek C18 o délce 20 mm po směru.

3.1.3 Třísmyčkový modulátor

Snaha zvýšit píkovou kapacitu s sebou přináší vývoj nových modulátorů. Jedním z nich je nový třísmyčkový modulátor (TSM). Toto rozhraní se skládá ze dvou deseticestných dvupolohových ventilů a jednoho dvanácticestného dvupolohového ventilu opatřeného třemi identickými zachytávacími smyčkami. Schéma zapojení je zobrazeno na Obrázku 39. Třísmyčkový modulátor má potenciál využívat pro zakoncentrování frakce ve smyčce izoelektrickou fokusací.

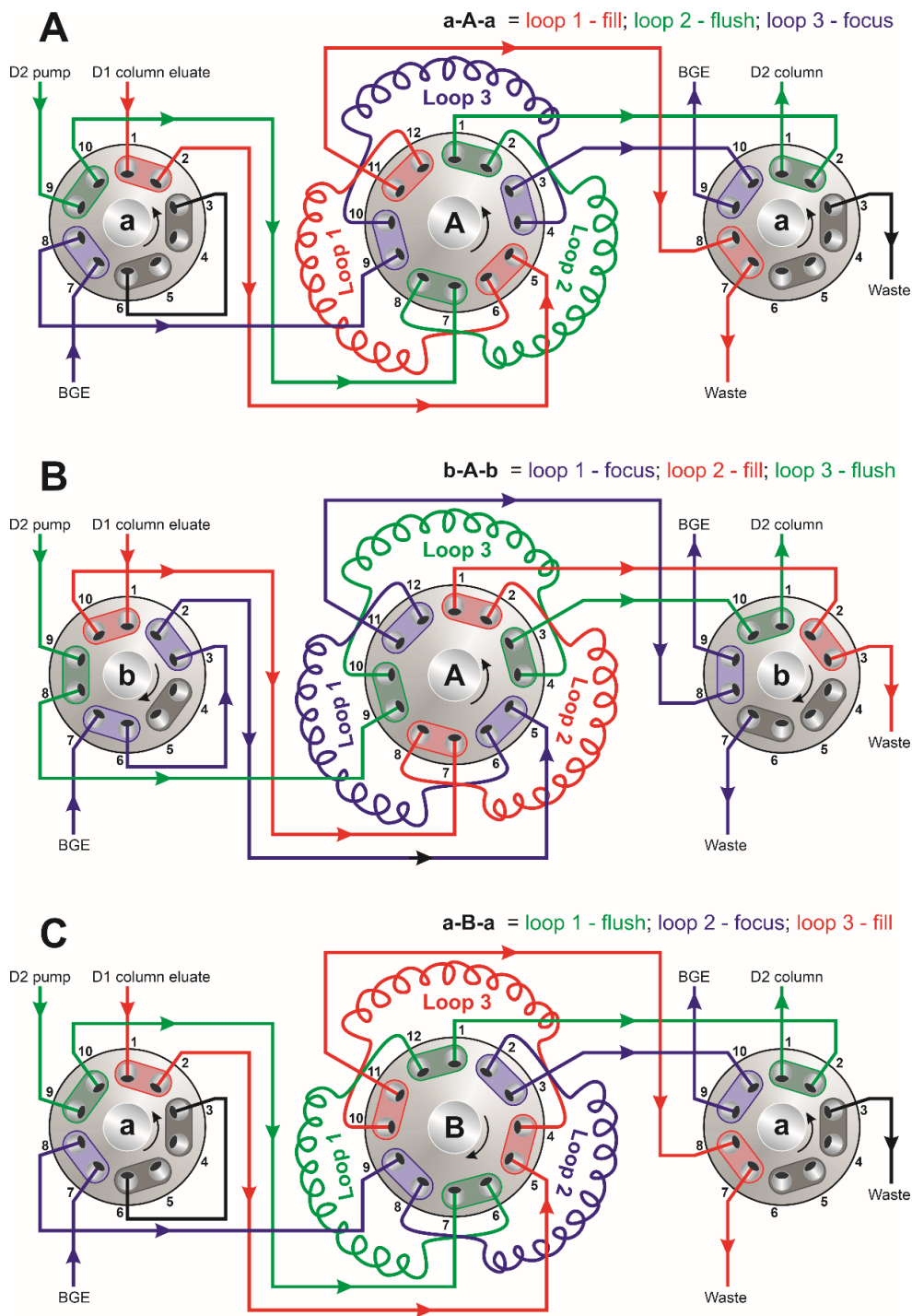
3.1.3.1 Princip fungování třísmyčkového modulátoru

Princip fungování třísmyčkového modulátoru spočívá v cyklickém přepínání ventilu do tří pozic. Schéma přepínání modulátoru je uvedeno na Obrázku 38.



Obrázek 38: Znáornění jednotlivých cyklů třísmyčkového modulátoru.

V první pozici (Obrázek 39A) se plní smyčka 1 eluátem z první kolony. Po 60 sekundách se ventil pootočí do polohy 2 (Obrázek 39B) a frakci ve smyčce 1 lze upravit nebo zakoncentrovat do úzké zóny, např. pomocí elektrického pole. Ve třetí poloze (Obrázek 39C) smyčkou 1 protéká mobilní fáze pro druhou dimenzi a unáší analyty na kolonu. U dalších dvou smyček probíhají stejné děje, ale pokaždé v jiné pozici ventilu (Obrázek 38), tedy v první poloze je na druhou smyčku aplikována fokusace nebo úprava frakce a třetí smyčka je vymývána mobilní fází do druhé dimenze. Po otočení ventilu do druhé pozice, mobilní fáze pro druhou dimenzi protéká druhou smyčkou a třetí smyčka se plní eluátem z první dimenze. Ve třetí pozici je smyčka 2 plněna a frakce ve smyčce 3 bude upravena. Tyto tři pozice se pravidelně opakují po celou dobu separace vzorku.



Obrázek 39: Konstrukce a jednotlivé pozice třísmýčkového modulátoru.

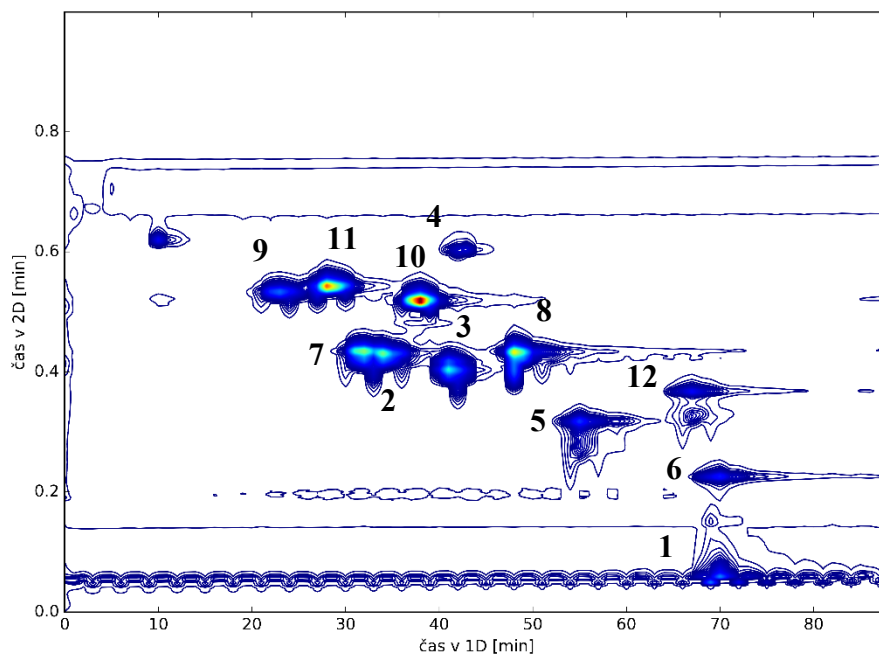
3.1.3.2 *Třísmyčkový modulátor se zachytávacími smyčkami*

Vlivu plného gradientu ve druhé dimenzi na píkovou kapacitu a výšku píku kyseliny sinapové bylo testováno při zapojení třísmyčkového modulátoru se třemi zachytávacími smyčkami do dvourozměrného kapalinového chromatografu. Všechny tři zachytávací smyčky byly identické a měly objem 20 μ l.

Nejprve bylo nutné ověřit chod a funkci modulátoru, proto na frakce ve smyčkách nebyla aplikována izoelektrická fokusace a modulátor se choval jako běžný dvupolohový ventil se smyčkami. Jedna smyčka byla plněna eluátem z první dimenze, druhá byla vymývána mobilní fází na druhou kolonu a frakce ve třetí smyčce čekala na přepnutí modulátoru do další pozice.

Průtok mobilní fáze ve druhé dimenzi byl nastaven na 2,8 ml/min. Byl nižší než u duo čtyřcestného dvupolohového ventilu se smyčkami, protože TSM ve své konstrukci obsahovala více spojovacích kapilár, které do celého systému přinesly větší tlakový odpor. Plný gradient ve druhé dimenzi byl nastaven podle Tabulky 7 v kapitole 2.3.2 a opět byly otestovány gradienty s různou počáteční koncentrací acetonitrilu (0, 10, 20 a 30 %) se zachováním rozsahu gradientu.

Ze získaných dat byla zjištěna šířka píku při základně a následně byla spočítána píkovaná kapacita. Stejně jako při ostatních měřeních byla odečtena výška píku kyseliny sinapové a z této hodnoty byl spočítán odstup signálu od šumu. Experimentální data byla využita pro tvorbu 2D chromatogramů (Obrázek 40 a Příloha 6). Všechny výsledky jsou uvedeny v Tabulce 12.



Obrázek 40: 2D chromatogram fenolických kyselin při zapojení TSM a nastaveném gradientu 0–40 % acetonitrilu v mobilní fázi druhé dimenze. Číslo píků jednotlivých kyselin jsou uvedena v Tabulce 4.

Při srovnání konturových chromatogramů fenolických kyselin se zapojeným duo čtyřcestným dvoupolohovým ventilem se smyčkami, modulací ředěním na koloně nebo třísmýčkovým modulátorem, bylo patrné, že píky získané při separaci s TSM měly více rozmytá čela než při zapojení modulace ředěním na koloně (Obrázek 37) nebo AG-smyčky (Obrázek 30). Frontování píků mohlo být způsobeno řadou faktorů. Jedním z nich je nekompatibilita rozpouštědla ve frakci s mobilní fází druhé dimenze nebo eluční síla solventu frakce. Tato síla byla příliš silná oproti mobilní fázi, kterou se smyčka vymývala.

Píky ve 2D chromatogramech získané při separacích s TSM byly méně rozmyté než píky získané při zapojení AG ventilu s trapovacími kolonkami zapojenými v protisměru. Na druhou stranu kolonky C18-20 zapojené po směru poskytly méně rozmyté píky než TSM modulátor.

Tabulka 12: Výsledky separace s využitím třísmýčkového modulátoru se třemi zachytávacími smýčkami bez aplikované izoelektrické fokuse na jednotlivé frakce.

c_{ACN} [%]	$w_{h/2}$ [min]	w [min]	$h_{kys. \text{ sinapová}}$ [mAU]	S/N	n_p
0-40	0,0161	0,0274	144,8	1405,6	26,6
10-50	0,0195	0,0331	175,9	1707,4	22,2
20-60	0,0273	0,0463	79,7	773,6	16,1
30-70	0,0226	0,0384	68,1	661,0	19,2

Píková kapacita získaná při gradientu 0–40 % a s třísmýčkovým modulátorem byla vyšší než u ventilu AG se smýčkami, a to o 12 %. Tato skutečnost je zajímavá a rozhodně neočekávaná. Naopak se předpokládalo, že díky vlivu spojovacích kapilár a tří ventilů bude píková kapacita u TSM nižší než u běžného modulátoru se smýčkami.

Nejvyšší pík kyseliny sinapové poskytla separace s koncentrací MF(A)_{D2} v mobilní fázi od 10 do 50 %. Při této koncentraci acetonitrilu bylo dosaženo také nejvyšší hodnoty odstup signálu od šumu, a to 1707,4, stejně jako u duo čtyřcestného dvoupolohového ventilu se smýčkami. Odstup signálu od šumu byl u TSM-smýčky vyšší o 23 % než u AG ventilu se smýčkami. Odstup signálu od šumu nekoreluje s píkovou kapacitou. Opět to může být způsobeno vzorkováním eluátu z první dimenze.

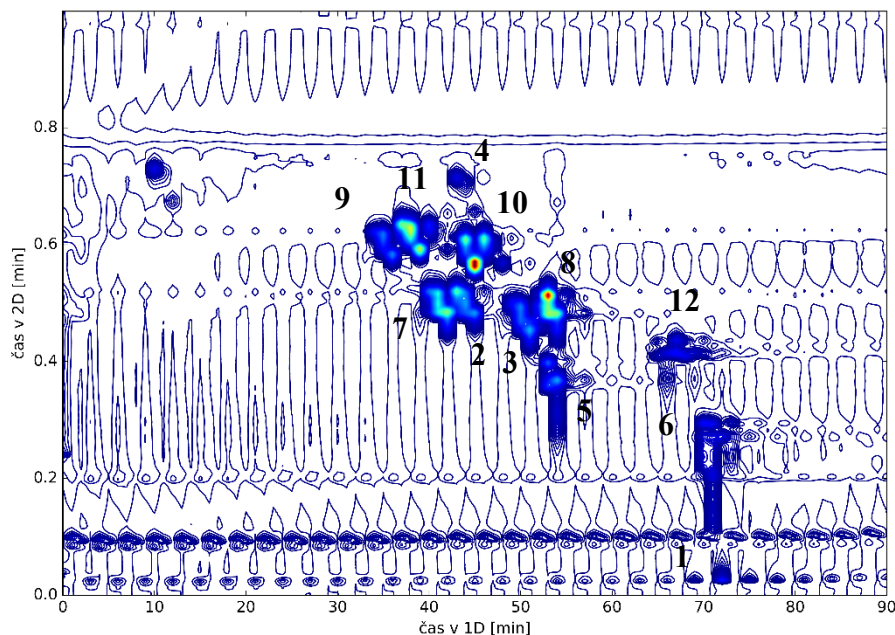
3.1.3.3 Třísmýčkový modulátor se zachytávacími kolonkami

Zvýšení píkové kapacity by mohly přinést trapovací kolonky, které se připojily ke třísmýčkovému modulátoru místo smýček. Na třísmýčkový modulátor byly tedy připojeny tři trapovací kolonky s oktadecyl-silikagelovou stacionární fází o velikosti 20×4 mm. Kolonky přinesly do systému větší tlakový odpor, a proto musel být snížen průtok na 2,4 ml/min oproti průtoku při zapojení smýček.

Konstrukce třísmýčkového modulátoru umožňovala zapojit trapovací kolonky pouze tak, že se dvě kolonky vymývaly po směru (Obrázek 39, kolonky v pozici smýček 1 a 2). Kdežto třetí kolonka (Obrázek 39, kolonka zapojená místo smýčky 3) se vymývala mobilní fází pro druhou dimenzi v protisměru.

Nejvyšší píková kapacita byla vždy dosažena při separaci s AG ventilem s trapovacími kolonkami a třísmýčkovým modulátorem se smýčkami u počáteční kon-

centrace acetonitrilu v mobilní fázi 0 %. Proto byla testována počáteční koncentrace při zapojení TSM s trapovacími kolonkami pouze s gradientem 0–40 % acetonitrilu v mobilní fázi. Výsledný 2D chromatogram je znázorněn na Obrázku 41.



Obrázek 41: 2D chromatogram fenolických kyselin získaný po separaci se zapojeným TSM se třemi zachytávacími kolonkami C18-20 a gradientem acetonitrilu 0–40 % v mobilní fázi. Číslo piků jsou vysvětlena v Tabulce 4.

Ve 2D chromatogramu (Obrázek 41) se projevilo to, že dvě smyčky byly vymývány po směru a třetí v protisměru. Díky posunu retenčního času ve druhé dimenzi pro frakci, která byla vymývána v protisměru, je jedna látka rozdělena do více piků ve 2D chromatogramu. Patrné je to asi nejvíce u kyseliny *p*-kumarové (10). I přes tuto skutečnost byla šířka piků a piková kapacita vyhodnocena a je uvedena v Tabulce 13. Zvlášť byla vyhodnocena separace po směru a protisměru.

Tabulka 13: Výsledky separace se zapojeným třísmyčkovým modulátorem a třemi trapovacími kolonkami C18 o délce 20 mm.

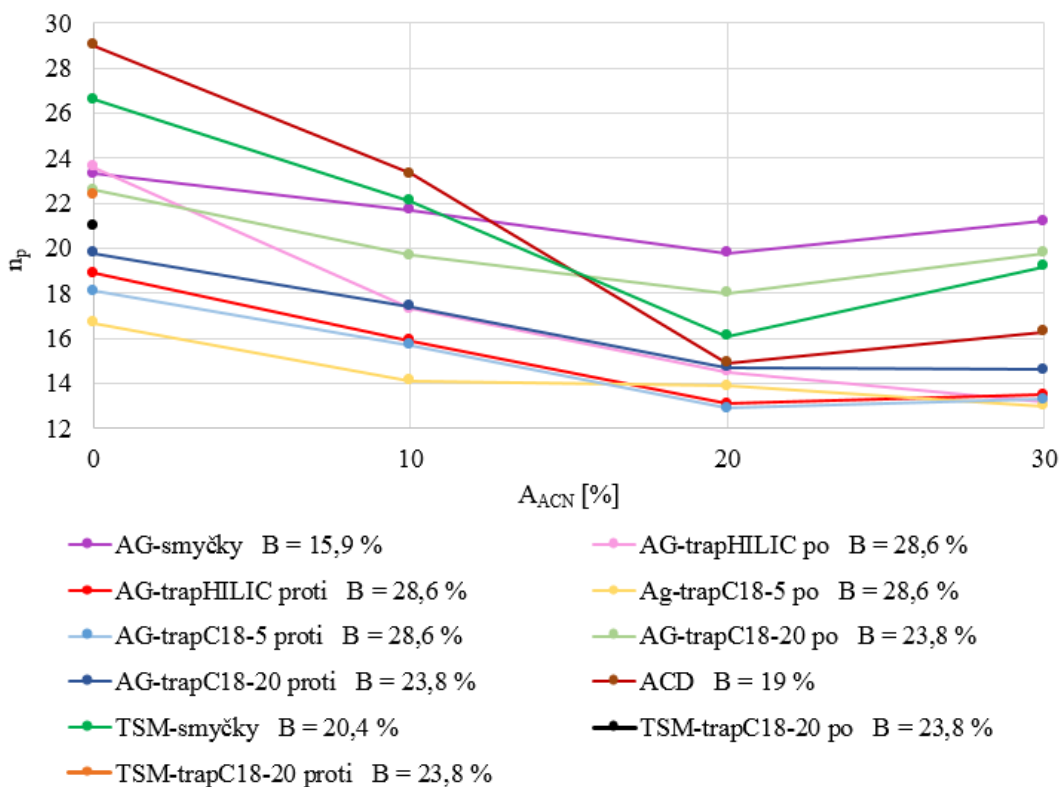
Druh zapojení	c_{ACN} [%]	$w_{h/2}$ [min]	w [min]	$h_{kys\ sinapové}$ [mAU]	S/N	n_p
Zapojení po směru	0–40	0,0206	0,0350	144,9	1406,8	21,0
Zapojení v protisměru	0–40	0,0192	0,0327	-	-	22,4

Píková kapacita po separaci s třísmyčkovým modulátorem s trapovacími kolonkami C18-20 byla nižší o 21 % (po směru) respektive asi o 16 % (protisměr) než při zapojení smyček na třísmyčkový modulátor. Kolonka zapojená v protisměru poskytla nepatrně větší píkovou kapacitu (22,4 oproti 21,0) než kolonky zapojené po směru. Kyselina sinapová se eluovala v kolonkách, které byly vymývány po směru, proto není v Tabulce 13 uvedena výška kyseliny sinapové při zapojení v protisměru. Hodnota odstupu signálu od šumu byla stejná jako při separaci s TSM-smyčky ($S/N = 1405,6$) a gradientu 0–40 %. Nicméně je zřejmé, že zachytávací kolonky nelze z důvodu rozdílného plnění a vymývání pro třísmyčkový modulátor použít.

3.2 Porovnání modulátorů podle píkových kapacit

Píková kapacita se používá pro hodnocení účinnosti separace. Čím se získá vyšší píková kapacita, tím jsou píky užší a vyšší. Když se získají vysoké píky při separaci, dosáhne se i vyššího odstupu signálu od šumu a sníží se mez detekce.

Všechny výše uvedené typy modulátorů, ať už se zapojenými zachytávacími smyčkami nebo kolonkami, byly porovnány z hlediska dosažených píkových kapacit a strmosti gradientu, B . Byla sestrojena závislost píkové kapacity na počáteční koncentraci acetonitrilu v mobilní fázi ve druhé dimenzi, které jsou znázorněny na Obrázku 42.



Obrázek 42: Závislost píkovej kapacity ve druhé dimenzi na počáteční koncentraci acetonitrilu v mobilní fázi pro všechny testované modulátory a zachytávací zařízení.

Nejvyšší píkovej kapacity bylo dosaženo při zapojení modulace ředěním na koloně (ACD), ale se zvyšující se počáteční koncentrací organické složky v mobilní fázi píkovej kapacita výrazně klesala. Stejně tak píkovej kapacita klesala i u třísmýčkového modulátoru se zachytávacími smyčkami (TSM-smyčky).

Naopak píkovej kapacita při použití duo čtyřcestného dvoupolohového ventilu se smyčkami (AG-smyčky) klesala se zvyšující se koncentrací ACN na počátku gradientu nejméně. U tohoto modulátoru byla použita nejnižší strmost gradientu, tudíž nejvyšší průtok mobilní fáze. Z toho vyplývá, že i průtok mobilní fáze ovlivňuje šířku píku ve druhé dimenzi.

Nejnižší píkovej kapacita byla pozorována ze všech použitých modulátorů a zachytávacích zařízení u kolonek s C18 stacionární fází o délce 5 mm zapojenými po směru (AG-trapC18-5 po). U tohoto modulátoru byla také strmost gradientu nejvyšší. Z použitých kolonek poskytly nejlepší píkovej kapacitu i při zvyšování

počáteční koncentrace acetonitrilu trapovací kolonky C18 o délce 20 mm zapojených po směru (AG-trapC18-20 po), kdy strmost gradientu byla nejnižší.

U většiny použitých modulátorů se zachytávacími smyčkami nebo kolonkami docházelo ke zvýšení píkové kapacity při počáteční koncentraci acetonitrilu v mobilní fázi 40 % oproti 30 %. S největší pravděpodobností to bylo způsobeno tím, že píky byly smyté a zároveň se eluovaly v blízkosti mrtvého objemu kolony druhé dimenze.

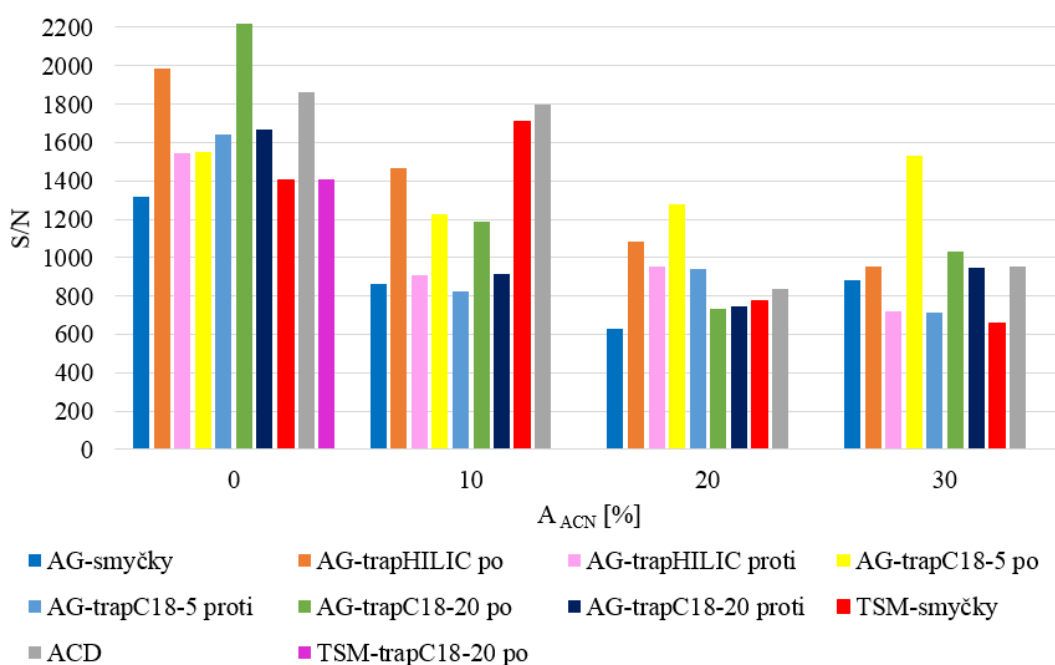
Obecně lze z Obrázku 42 konstatovat, že pro separaci fenolických kyselin byly lepší z pohledu píkové kapacity zachytávací smyčky než kolonky a nejlepší nastavení gradientu bylo od 0 do 40 % acetonitrilu v mobilní fázi pro druhou dimenzi.

3.3 Vliv gradientu mobilní fáze ve druhé dimenzi na výšku píku

Výška píku souvisí se šířkou píku, která se využívá pro výpočet píkové kapacity. Čím je pík nižší, tím bude mít i větší šířku. Protože výška píku je kritickým faktorem při integraci píku a z výšky píku a šumu detektoru se velmi často určuje mez detekce a mez stanovitelnosti metody, je velice nezbytné, aby byl pík o stejné ploše, pokud možno co nejvyšší a co nejužší. Kvalitu signálu můžeme hodnotit jako poměr signálu (právě výšky píku) k šumu detektoru (Rovnice 5).

V jednorozměrné chromatografii je výška píku ovlivněna pouze vlastními podmínkami separace (gradient, účinnost kolony, objem dávkovaného vzorku apod.), nicméně ve dvourozměrné chromatografii je ovlivněna i vzorkováním. Stačí, aby došlo k menšímu posunu v retenčním čase v první dimenzi a při stejné rychlosti vzorkování může dojít k posunu frakcí. Tedy když se pík z první dimenze rozdělí při vzorkování přesně uprostřed na dvě frakce, tak v obou frakcích bude stejná koncentrace látky. Po separaci frakcí na koloně ve druhé dimenzi se získají píky, které budou mít stejnou výšku. Ale výška těchto píků bude nižší, než když se při rozdělení píku z první dimenze získají tři frakce. V prostřední frakci se bude nacházet největší koncentrace analytu, a tím bude hodnota výšky píku ve druhé dimenzi největší.

Pro vyhodnocení výšky píku byla zvolena kyselina sinapová (ve 2D chromatogramech číslo 9), protože se eluovala jako první z první dimenze a nebyla ovlivněna dalšími koelujícími sloučeninami. Ze záznamů snímaných při vlnové délce 280 nm byla vyhodnocena výška šumu, která byla pro všechny separace stejná a měla hodnotu 0,1030 mAU. Odstup signálu od šumu je uveden ve výsledcích separací pro jednotlivé modulátory (Tabulka 9, 10, 11 a 12). Závislost odstupu signálu od šumu na počáteční koncentraci acetonitrilu v mobilní fázi druhé dimenze je uvedena na Obrázku 43.



Obrázek 43: Závislost poměru odstupu signálu od šumu na počáteční koncentraci acetonitrilu v mobilní fázi pro druhou dimenzi.

Nejvyšší hodnoty S/N bylo dosaženo při gradientu od 0 do 40 % acetonitrilu v mobilní fázi pro všechny modulátory. Z Obrázku 43 vyplývá, že nejvyššího poměru odstupu signálu od šumu při stále stejném rozsahu gradientu bylo dosaženo s duo čtyřcestným dvoupolohovým ventilem se dvěma zachytávacími kolonkami C18 o délce 20 mm (AG-trapC18-20), které byly vymývány mobilní fází po směru plnění eluátem. Zajímavé ale je, že druhá nejvyšší hodnota poměru S/N při gradientu 0–40 % ACN byla dosažena při zapojení trapovacích kolonek HILIC

(AG-trapHILIC po) po směru, i když při separaci dosáhly při tomto gradientu nejvyšší píkové kapacity.

Lze konstatovat, že při využití počáteční koncentrace MF(B)_{D2} 10 %, 20 % a 30 % a při zapojení duo čtyřcestného dvoupolohového ventilu se zachytávacími smyčkami nebo kolonkami po směru se získal vyšší pík než při zapojení zachytávacích kolonek do protisměru.

Využití modulace ředěním na koloně (ACD) a gradientu 0–40 % a 10–50 % poskytla výrazně vyšší odstup signálu od šumu než většina použitých rozhraní.

3.4 Úprava frakce mezi první a druhou dimenzí pomocí TSM

Jak již bylo uvedeno výše, jedním ze způsobů, jak zvýšit píkovou kapacitu ve druhé dimenzi a snížit mez detekce analytů, je zakoncentrování frakce před separací na druhé koloně. Fokusaci nebo i jiná úprava frakce před další analýzou umožňuje třísmyčkový modulátor. Jednou z použitelných metod, jak frakci upravit do užší zóny, je izoelektrická fokusace.

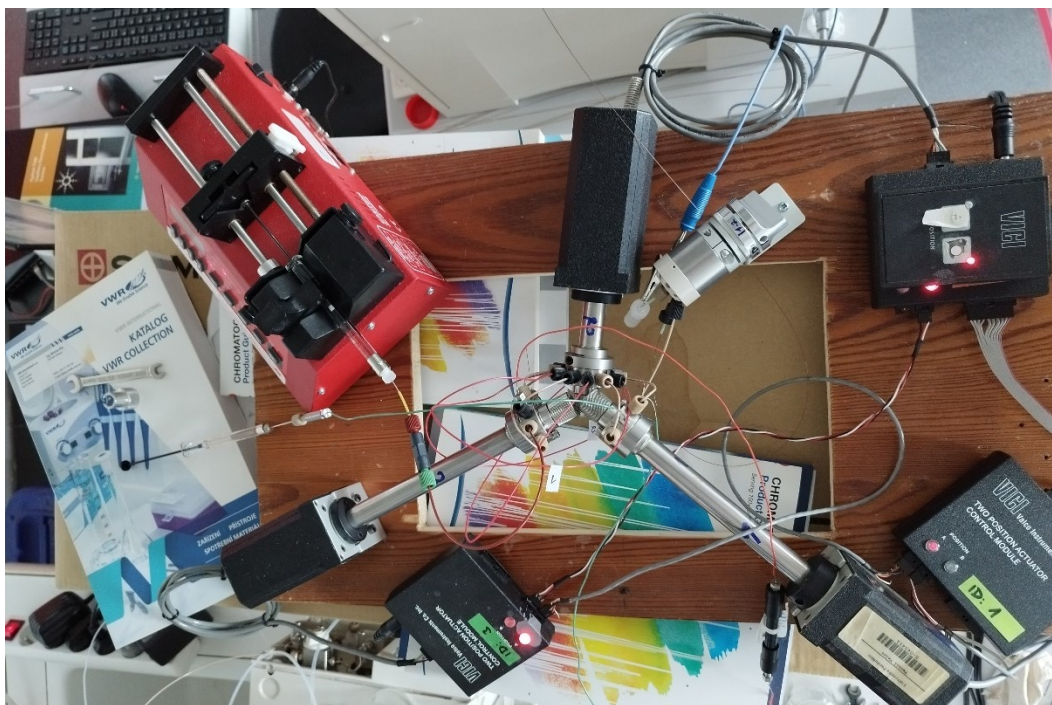
Izoelektrická fokusace se používá pro dělení a zakoncentrovávání vícekrát nabitých sloučenin. Molekula s povrchovým nábojem se při vkládaném napětí pohybuje elektrolytem a zastaví se v místě, kde se stane neutrální látkou [47].

Ověření, zda vůbec bude možné zapojit kapilární elektroforézu k třísmyčkovému modulátoru, zda půjde frakci ze zachytávací smyčky vytlačit do kapiláry v kapilární elektroforéze, provést fokusaci a následně frakci vytlačit zpět do zachytávací smyčky, bylo provedeno pouze na jedné smyčce (frakci) (Obrázek 39, smyčka 2).

3.4.1 Zapojení kapilární elektroforézy k TSM

Ještě, než byla k třísmyčkovému modulátoru připojena kapilární elektroforéza, bylo potřeba částečně upravit konstrukci TSM, a tím co nejvíce zkrátit spojovací kapiláry. Zkrácení kapilár bylo důležité z toho důvodu, že ve 2D chromatogramech (Obrázek 40 a 41) bylo patrné, že mrtvý objem kolony ve druhé dimenzi nebyl konstantní, ale během separace se měnil (skákal) podle toho, jaká smyčka byla

zrovna analyzována ve druhé dimenzi. Bylo to způsobené tím, že spojovací kapiláry měly rozdílnou délku, a tedy i vnitřní objem (vnitřní průměr 0,13 mm). Reálná konstrukce upraveného třísmyčkového modulátoru a propojení s kapilární elektroforézou a injekční pumpou je znázorněno na Obrázku 44.

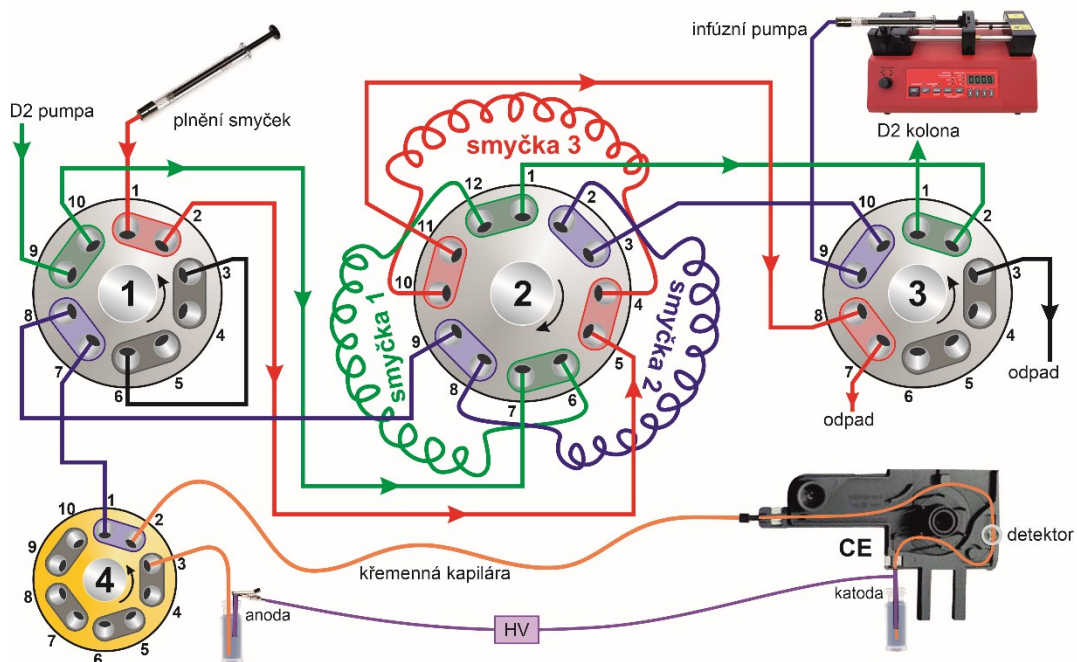


Obrázek 44: Konstrukce TSM modulátoru po zkrácení spojovacích kapilár a reálné zapojení třísmyčkového modulátoru, injekční pumpy a kapilární elektroforézy.

Propojení třísmyčkového modulátoru a kapilární elektroforézy bylo provedeno přes dvupolohový deseticestný ventil, který byl vyrobený z nevodivého materiálu polyetheretherketon (zkráceně PEEK ventil). Ventil musel být nevodivý, aby nedošlo k poškození elektrických zařízení vlivem vysokého napětí vkládaného na kapiláru v elektroforéze. K PEEK ventilu byla do portu 2 připojena kapilára z elektroforézy (Obrázek 45, ventil 4) a do portu 1 spojovací kapilára z třísmyčkového modulátoru (Obrázek 45, ventil 1).

Dále byla k PEEK ventilu připojena krátká křemenná kapilára o vnitřním průměru 75 μm , která se ponořila do vialky s elektrolytem a platinovou elektrodou (Obrázek 45, ventil 4 – port 3). Platinová elektroda se připojila ke zdroji napětí vyvedeného z elektroforézy. Druhá vialka s elektrolytem se umístila na konec kapiláry v elektroforéze. Kapilára v elektroforéze měla délku 75 cm nebo 120 cm. Okénko

na kapiláře pro DAD detektor bylo umístěno 25 cm od konce. Detektor diodového pole v kapilární elektroforéze snímal signál při vlnových délkách 254 a 280 nm.



Obrázek 45: Propojení třísmyčkového modulátoru (poloha 3), injekční pumpy, dvoupolohového deseticestného ventilu z PEEK materiálu a kapilární elektroforézy.

Na dvanácticestný dvoupolohový ventil byly připojeny tři zachytávací smyčky o objemu 4,5 μl (Obrázek 45, ventil 2). Dále byla k třísmyčkovému modulátoru připojena injekční pumpa s Hamilton stříkačkou o objemu 250 μl , která byla naplněná elektrolytem nebo vodou (na Obrázku 45 ventil 3 – port 1), která sloužila pro vytlačení vzorku ze zachytávací smyčky do křemenné kapiláry v elektroforéze. První dimenzi, kterou by se smyčky plnily, představovala stříkačka Hamilton o objemu 250 μl a sloužila k dávkování vzorku do zachytávací smyčky 2 (ventil 1 – port 1).

3.4.2 Vytlačení frakce ze smyčky do kapiláry elektroforézy

V prvním kroku bylo potřeba přemístit zachycenou frakci ve smyčce 2 (Obrázek 45) do kapiláry elektroforézy. K tomuto účelu posloužila infuzní (injekční) pumpa se stříkačkou naplněnou elektrolytem. Na injekční pumpě bylo možné nastavit jak rychlost průtoku, tak vytlačený objem. Ideální podmínky nastavení průtoku a objemu na injekční pumpě pro vytlačení frakce ze smyčky do kapiláry elektroforézy musely být optimalizovány. Kapilára pro elektroforézu měla délku 75 cm a vnitřní průměr 75 μm .

Postup byl následující: roztok dvou fenolických kyselin v methanolu byl do smyčky nadávkován ručně pomocí Hamilton stříkačky (poloha modulátoru 2). Po přepnutí modulátoru do polohy 3 a zpuštění injekční pumpy s Hamilton stříkačkou naplněnou vodou se frakce ze zachytávací smyčky vytlačila přes spojovací kapiláry a ventily č. 1 a 4 do kapiláry elektroforézy. Zároveň byl měřen čas do té doby, než se v detektoru diodového pole v elektroforéze neobjevil začátek signálu. Testovaný průtok byl postupně zvyšován od 10 do 500 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Ze získaných údajů byl spočítán objem, který byl potřeba nastavit na injekční pumpě, aby se frakce ze smyčky 2 dostala do cely detektoru v kapilární elektroforéze. Vypočítaný objem byl přibližně konstantní při nastaveném průtoku od 50 do 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. Na injekční pumpě byl tedy pro další pokusy průtok nastaven na 50 $\mu\text{l}/\text{min}$. Průměrný čas potřebný k tomu, aby se frakce ze smyčky dostala do cely detektoru, byl 14,9 s, proto objem dávkovaný injekční pumpou měl hodnotu 12 μl . Při tomto objemu je po zatlačení roztoku kyseliny protokatechuové a kyseliny *p*-kumarové v methanolu do kapiláry elektroforézy vidět v cele DAD detektoru začátek zóny těchto látek.

Stejným postupem se optimalizovaly parametry pro injekční pumpu při výměně 75cm kapiláry za delší 120cm. Výsledky byly následující: $F_m = 50 \mu\text{l}/\text{min}$, $\bar{t} = 16,2 \text{ s}$, $V = 13,5 \mu\text{l}$.

3.4.3 Vytlačení roztoku z kapiláry elektroforézy do zachytávací smyčky

Dále bylo potřeba zjistit, jak nejrychleji vytlačit roztok z kapiláry elektroforézy zpět do zachytávací smyčky. Vytlačení roztoku se provedlo pomocí tlaku dodávaným tlakovým čerpadlem v kapilární elektroforéze nebo díky tlaku dusíku přivedeného do elektroforézy z centrálního rozvodu.

Byl stanoven čas od vialky v kapilární elektroforéze k okénku detektoru. Kapilára v elektroforéze měla délku 75 cm. Pokus byl proveden tak, že se vialka naplnila roztokem dvou fenolických kyselin rozpuštěných v methanolu. Spustil se program aplikace tlaku pomocí tlakového čerpadla („flush“) nebo aplikace tlaku dusíku v elektroforéze a zároveň byl měřen čas. Zároveň stejným způsobem bylo určeno vhodné nastavení tlaku dusíku. Tlak dusíku byl postupně měněn: 2, 3, 4, nebo 5 bar. Výsledky času při různém tlaku dusíku jsou uvedeny v Příloze 7 – Tabulka P7.1. Roztok se z vialky do cely detektoru dostal nejrychleji při tlaku dusíku 5 bar.

Získané průměrné časy jak při aplikaci programu „flush“, tak tlaku dusíku byly použity pro výpočet rychlosti průtoku, ze kterého byl následně zjištěn čas, za jak dlouho se roztok od cely detektoru v elektroforéze dostal zpět do zachytávací smyčky 2. Výsledky jsou uvedeny v Příloze 7 v Tabulce P7.2.

Ze získaných dat bylo zřejmé, že pumpa v programu „flush“ pro vytlačení roztoku z kapiláry zpět do smyčky nelze použít, protože vytlačení roztoku z kapiláry elektroforézy do zachytávací smyčky trvalo velmi dlouho (3,3 min) a neposkytovala stabilní rychlost průtoku. Aplikace tlaku dusíku měla příznivější výsledek, a to 18 s.

Poté byla kapilára v elektroforéze vyměněna za delší kapiláru o délce 120 cm, aby se celý objem frakce v zachytávací smyčce vešel do kapiláry v elektroforéze. Celý postup stanovení času potřebného na vytlačení roztoku z kapiláry elektroforézy zpět do zachytávací smyčky byl zopakován i pro delší kapiláru. Prodloužením kapiláry se prodloužil i čas potřebný pro vytlačení vzorku z kapiláry zpět do smyčky na 24 s, což odpovídalo objemu 8,8 μ l (Příloha 7, Tabulka P7.2).

Ověření vypočítaného času potřebného na vytlačení roztoku z kapiláry zpět do smyčky bylo provedeno tak, že za zachytávací smyčku byl připojen detektor

diodového pole ze dvourozměrného kapalinového chromatografu. Vlnová délka, při které detektor snímal signál byla nastavena na 254 nm a 280 nm.

Nejprve se pomocí Hamilton jehly naplnila zachytávací smyčka roztokem kyseliny protokatechuové a kyseliny *p*-kumarové v methanolu, když se modulátor nacházel v poloze 2. Modulátor se otočil do polohy 3 a pomocí injekční pumpy ($F_m = 50 \mu\text{l}/\text{min}$, $V = 13,5 \mu\text{l}$) se frakce ze smyčky vytlačila do kapiláry v elektroforéze. Pak byla odpojena kapilára vedoucí k injekční pumpě (Obrázek 45, ventil 2 – port 3) a místo ní byla připojena spojovací kapilára do DAD detektoru. Následně byl aplikován tlak dusíku ($p = 5 \text{ bar}$) a zároveň měřen čas, dokud se v DAD detektoru neobjevil signál. Postup byl několikrát zopakován. Průměrný čas od cely detektoru v elektroforéze po detektor ve 2D-LC byl stanoven na 36 s. Z této hodnoty byl spočítán objem ($13,2 \mu\text{l}$). Následně se musel odečíst objem spojovací kapiláry ($5 \mu\text{l}$) mezi zachytávací smyčkou a detektorem diodového pole ve 2D-LC. Výsledný objem potřebný na vytlačení roztoku z kapilární elektroforézy zpět do smyčky měl hodnotu $8,2 \mu\text{l}$. Hodnota objemu zjištěného experimentální cestou byla velmi podobná objemu získaného výpočtem (Příloha 7, Tabulka P7.2).

3.4.4 Propojení TSM, kapilární elektroforézy a kolony druhé dimenze

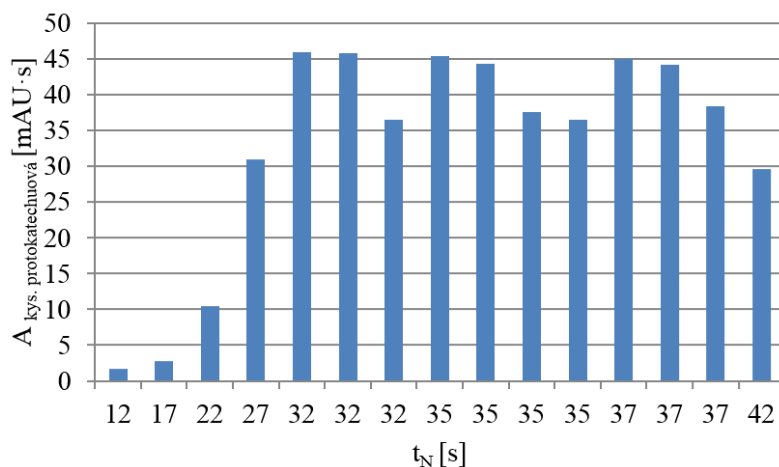
Když byly zjištěny všechny parametry uvedené výše, k třísmýčkovému modulátoru byla připojena kolona pro druhou dimenzi (Obrázek 45, ventil 3 – port 1). Úkolem bylo ověřit a případně upravit nalezené optimální nastavení injekční pumpy, čas pro aplikaci dusíku při tlaku 5 bar a zda se úspěšně povede přemístit frakci do a z kapiláry elektroforézy. Při nastavení špatných parametrů totiž dojde k tomu, že analyty zůstanou ve spojovací kapiláře, která se nachází před zachytávací smyčkou nebo naopak za zachytávací smyčkou. Kapilára v elektroforéze měla délku 120 cm.

Zachytávací smyčka o objemu $4,5 \mu\text{l}$ byla plněna roztokem kyseliny protokatechuové a kyseliny *p*-kumarové v methanolu v poloze modulátoru 2. Pak byl modulátor otočen do polohy 3 a byla spuštěna injekční pumpa s Hamilton stříkačkou naplněnou vodou, která měla nastavený průtok na $50 \mu\text{l}/\text{min}$ a objem vytlačované vody na $13,5 \mu\text{l}$. Po vypnutí byla injekční pumpa odpojena od modulátoru

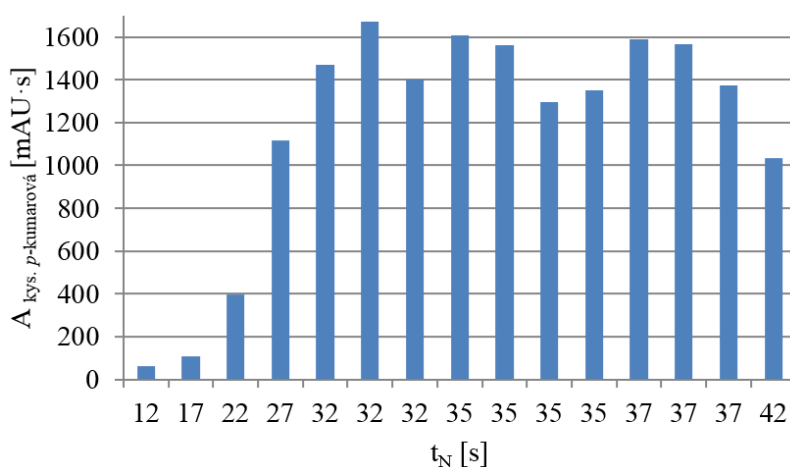
a v řídicím programu kapilární elektroforézy byla spuštěna aplikace dusíku za podmínek: tlak 5 bar a čas působení 22 s (t_N). Následně byla spuštěna analýza v řídicím programu UHPLC (pro separaci se využila druhá dimenze dvourozměrného kapalinového chromatogramu) a modulátor byl otočen do polohy 1. Separace probíhala za isokratických podmínek (15 % acetonitrilu a 85 % vodné fáze) na koloně C18, která byla použita i pro druhou dimenzi 2D-LC separací. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1,6 ml/min. Separace kyselin probíhala po dobu 3 minut. Jak bylo již zmíněno výše, bylo také potřeba ověřit, jaké množství analytů zůstalo ve spojovacích kapilárách, ať už před zachytávací smyčkou nebo za ní. Proto po skončení separace frakce byl modulátor otočen do polohy 2 a analýza probíhala další 3 minuty. Tímto způsobem se na kolonu dostal a zjistil obsah kapilár před a za smyčkou 2. Čas aplikace tlaku dusíku, t_N , se měnil a byly sledovány plochy jednotlivých fenolických kyselin (Příloha 7 – Tabulka P7.3).

Mimoto bylo nutné zjistit, jaká byla plocha píků, pokud se frakce nevytlačovala ze smyčky do kapilární elektroforézy, a tedy jaké plochy by mělo být ideálně dosaženo při pokusech s vytlačení frakce ze smyčky do kapilární elektroforézy a následně zpět do zachytávací smyčky na třísmyčkovém modulátoru. Roztok fenolických kyselin byl opět nadávkován do smyčky č. 2 v poloze modulátoru 2. Poté byl modulátor otočen do polohy 3 a mobilní fázi se promyly spojovací kapiláry v modulátoru, aby následně mohl být separován pouze obsah smyčky. V řídicím programu byla spuštěna analýza a modulátor byl otočen do polohy 1. Analýza probíhala po dobu 3 minut.

Z chromatogramu snímaného při vlnové délce 280 nm byly vyhodnoceny plochy píků kyseliny protokatechuové a kyseliny *p*-kumarové. Plochy píků získané při různě dlouhém působení tlaku dusíku o 5 bar v kapilární elektroforéze jsou uvedeny v Příloze 7, v Tabulce P7.3. Do grafů byly vyneseny závislosti ploch píků kyseliny protokatechuové (Obrázek 46) a kyseliny *p*-kumarové (Obrázek 47) získané separací frakce ve smyčce (modulátor v poloze 1) na čase působení tlaku dusíku, t_N .



Obrázek 46: Závislost ploch píků kyseliny protokatechuové na čase působení tlaku dusíku 5 bar.



Obrázek 47: Závislost ploch píků kyseliny p-kumarové na čase působení tlaku dusíku 5 bar.

Z Obrázků 46 a 47 je patrné, že největší plochy píků fenolických kyselin bylo dosaženo při aplikaci tlaku dusíku v kapilární elektroforéze po dobu 32, 35 a 37 sekund. Plochy píků se při těchto časech mezi s sebou moc neliší. Nižší hodnoty ploch píků mohou být způsobeny nestabilním tlakem dusíku a nestabilní rychlostí ustálení tlaku v kapiláře. Pro další pokusy byla používána aplikace tlaku dusíku po dobu 35 s.

3.4.5 Izoelektrická fokusace

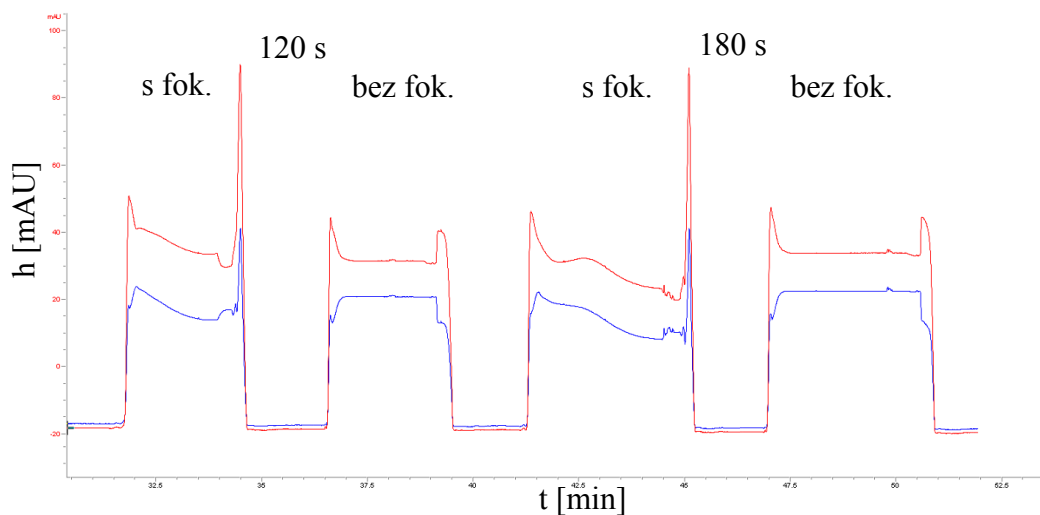
Aplikace stejnosměrného elektrického napětí na křemennou kapiláru v elektroforéze způsobí to, že se nabitě analyty vlivem elektrického pole a elektroosmózy začnou pohybovat směrem ke katodě. Kyselina protokatechuová a kyselina *p*-kumarová byly rozpuštěny ve 20% methanolu, takže molekuly jsou disociované a na povrchu mají náboj. Na elektrodu blíže k detektoru (výstupní elektroda) se vkládá vysoké záporné napětí.

Frakce ze smyčky 2 byla vytlačena pomocí injekční pumpy do kapiláry elektroforézy, na kterou se aplikovalo záporné vysoké napětí. Zda proběhlo zakoncentrování nebo ne, bylo zjištěno tak, že se roztok z kapiláry následně vytlačil pomocí injekční pumpy do cely detektoru, kde byl hodnocen tvar signálu.

Nejprve bylo potřeba nalézt ideální podmínky pro fokusaci v kapilární elektroforéze. Muselo se stanovit ideální napětí a jeho doba působení pro co největší fokusaci analytů. Vodivé spojení v kapiláře bylo získáno propojením vialek naplněných borátovým pufrem o koncentraci 0,01 mol/l přes PEEK ventil.

Roztok kyseliny protokatechuové a kyseliny *p*-kumarové ve 20% methanolu byl pomocí stříkačky nadávkován do smyčky v poloze modulátoru 2. V poloze modulátoru 3 se frakce pomocí injekční pumpy a stříkačky naplněné borátovým pufrem ($F_m = 50 \mu\text{l}/\text{min}$, $V = 13,5 \mu\text{l}$) posunula do kapiláry elektroforézy. Pak byl otočen PEEK ventil do druhé pozice, aby se propojily vialky s borátovým pufrem. V ovládacím programu kapilární elektroforézy byla spuštěna aplikace napětí při -20 kV po dobu 120 s. Po skončení aplikace napětí na kapiláru, byl PEEK ventil otočen do první pozice a pomocí injekční pumpy s $F_m = 50 \mu\text{l}/\text{min}$ se obsah kapiláry vytlačil přes celou detektoru do odpadové vialky. Detektor snímal signál při vlnových délkách 254 a 280 nm. Stejný postup byl zopakován i pro čas aplikace napětí 180 s.

Zároveň bylo vždy provedeno měření bez fokusace. Postup byl stejný, jen místo aplikace napětí byl roztok v kapiláře ponechán v klidu po daný čas a následně byl vytlačen přes detektor do odpadu. Signály sledované na detektoru jsou ukázané na Obrázku 48. Částečné fokusace bylo dosaženo. Signál se při vytlačení zvýšil a zúžil. Zda ke zúžení píku nedošlo pouze vlivem rychlého vytlačení do cely detektoru bylo ověřeno při snížení průtoku na injekční pumpě.



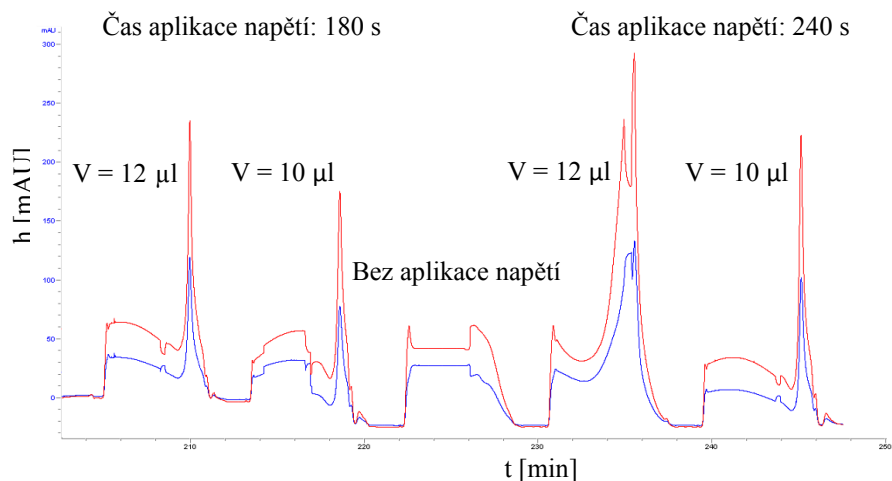
Obrázek 48: Záznam signálu kyseliny protokatechuové a kyseliny *p*-kumarové při aplikaci napětí -20 kV v různém čase, kdy na injekční pumpě byl průtok při vytlačování kapaliny z kapiláry do cely detektoru nastaven na 50 μ l/min. Zkratka s fok. značí signál po vložení napětí, bez fok. znamená, že na kapiláru nebylo vloženo napětí.

Při dalším pokusu bylo přistoupeno k tomu, že frakce ze smyčky se pomocí injekční pumpy vytlačila do kapiláry, ale v cele detektoru nesměl být vidět žádný signál ($V = 5 \mu$ l) a při vytlačení roztoku kyseliny protokatechuové a *p*-kumarové z kapiláry do cely DAD detektoru byl snížen průtok nastavený na injekční pumpě na 2 μ l/min. Napětí na kapiláře bylo zvýšeno v řídicím programu na -25 kV a opět byly testovány různé časy fokusace: 180 s a 240 s. Záznam z detektoru je uveden v Příloze 8 – Obrázek P8.1. Z tohoto záznamu nebyla patrná žádná fokusace.

Při fokusaci za použití borátového pufru nedocházelo k výraznému zakoncentrování signálu, nejpravděpodobněji to bylo způsobeno nevhodným elektrolytem. Musel být otestován i jiný elektrolyt než borátový pufr.

Postup práce byl zopakován s jiným elektrolytem, a to 75 mM kyselinou boritou o pH 9, s cílem dosáhnout zakoncentrování roztoku kyseliny protokatechuové a kyseliny *p*-kumarové ve 20% methanolu. Objem nastavený na injekční pumpě byl 10 anebo 12 μ l, aby se do kapiláry dostalo více frakce ze zachytávací smyčky. Při těchto objemech se v cele detektoru vždy objevil začátek signálu. Vložené napětí na kapiláru bylo sníženo na -20 kV (během fokusace bylo stabilní) z důvodu nestabilního napětí při -25 kV (-25 kV bylo dosaženo pouze ihned po spuštění, ale po zbytek času fokusace se napětí snížilo na -18 kV). Průtok na injekční pumpě

při vytlačování roztoku po fokusaci přes celou detektoru do odpadu byl nastaven na 2 $\mu\text{l}/\text{min}$. Opět byla testována různá délka času fokusace: 180 a 240 s. Výsledný záznam z DAD detektoru je znázorněn na Obrázku 49.



Obrázek 49: Záznam z DAD detektoru v kapilární elektroforéze bez a po izoelektrické fokusaci vzorku kyseliny protokatechuové a *p*-kumarové. Značka *V* značí objem, který byl nastavený na injekční pumpě při vytlačení frakce ze smyčky do kapiláry elektroforézy.

Na Obrázku 49 byl jasně patrný rozdíl mezi postupem, při kterém bylo aplikováno vysoké napětí a při kterém aplikováno nebylo (uprostřed). Nejdříve po aplikaci záporného vysokého napětí začal signál v detektoru mírně růst a následně klesal. Při nastavení času aplikace napětí 240 s a objemu na injekční pumpě 12 μl začal signál po poklesu výrazně stoupat již během fokusace (rozštěpení píku bylo způsobeno koncem aplikace napětí). Po vytlačení zafokusovaného roztoku se na detektoru objevil úzký a vysoký pík. Výměna elektrolytu borátového pufru za 75 mM roztok kyseliny borité přinesla vyšší a užší signál a došlo k zakoncentrování kyseliny protokatechuové a *p*-kumarové do užší zóny o větší intenzitě signálu, než poskytovala samotná frakce. Bohužel pro nedostatek času nemohl být vyzkoušen přínos izoelektrické fokusace na šířku píku ve druhé dimenzi.

4 Závěr

Vliv počáteční koncentrace silnější eluční složky v gradientu v mobilní fázi ve druhé dimenzi pro různé druhy modulátorů a zachytávacích zařízení na rozmývání píků ve druhé dimenzi byl hodnocen podle píkové kapacity. Nejvyšší píkova kapacita o hodnotě 29,0 byla dosažena při zapojení modulace ředěním na koloně a nastaveném gradientu ve druhé dimenzi na 0–40 % acetonitrilu v mobilní fázi. Při zvyšování počáteční koncentrace acetonitrilu píkova kapacita výrazně klesala.

Z trapovacích kolonek poskytly nejvyšší píkova kapacitu (23,6) trapovací kolonky HILIC se silikagelovou stacionární fází a při nastaveném gradientu 0–40 % acetonitrilu. Píkova kapacita při vyšších počátečních koncentracích výrazně klesala. Kolonky C18 o velikosti 20×4 mm zapojené po směru poskytly při těchto výšších počátečních koncentracích vyšší píkova kapacitu. U tohoto modulátoru bylo také dosaženo nejvyšší hodnoty odstupe signálu od šumu.

Třísmýčkový modulátor se třemi zachytávacími smyčkami poskytoval při gradientu acetonitrilu 0–40 % vyšší píkova kapacitu (26,6) než duo čtyřcestný dvoupolohový ventil se zachytávacími smyčkami (23,3).

Nejvyšších píkových kapacit bylo ve většině separací dosaženo při počáteční koncentraci acetonitrilu 0 %. Naopak při koncentraci 20–60 % acetonitrilu v mobilní fázi byly píkova kapacity nejnižší. Gradient 30–70 % není vhodný pro separaci fenolických kyselin, protože se píky eluují v blízkosti mrtvého objemu kolony ve druhé dimenzi a navzájem koeluují.

Třetí smyčka ve třísmýčkovém modulátoru má potenciální využití na izoelektrickou fokusaci. Podařilo se frakci ze zachytávací smyčky vytlačit do kapiláry v elektroforéze pomocí injekční pumpy ($F_m = 50 \mu\text{l}/\text{min}$, $V = 13,5 \mu\text{l}$), roztok z kapiláry vytlačit zpět do zachytávací smyčky pomocí aplikace tlaku dusíku 5 bar při délce trvání 35 s a následně provést separaci na koloně druhé dimenze. Bylo prokázáno zlepšení (zvýšení) signálu po aplikaci záporného vysokého napětí -20 kV po dobu 180 sekund s elektrolytem roztoku 75 mM kyseliny borité o pH 9. Pozitivní vliv izoelektrické fokusace na šířku píku po separaci na koloně druhé dimenze nebyl z důvodu nedostatku času při vypracování diplomové práce stanoven.

5 Použitá literatura

- 1 NOVÁKOVÁ, L., M. DOUŠA, P. ČESLA a kolektiv. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. 2*. Brno: Česká chromatografická škola, 2021. ISBN 978-80-270-8559-0.
- 2 CARR, P. W. a D. R. STOLL. Two-dimensional liquid chromatography: principles, practical implementation and applications. Germany: Agilent Technologies, 2015. ISBN 5991-2359EN.
- 3 CHEN, Y., Y. WU, X. LIU, B. LI, D. HU, S. HUANG, M. MA a B. CHEN. Pulsed elution modulation for on-line comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupling reversed phase liquid chromatography and hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2018, **2019**(1583), 98-107. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.11.023>
- 4 FORNELLS, E., B. BARNETT, M. BAILEY, E. F. HILDER, R. A. SHELLIE a M. C. BREADMORE. Evaporative membrane modulation for comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*. 2018, **2018**(1000), 303-309. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.11.053>
- 5 STOLL, D. R., K. SHOYKHET, P. PETERSSON a S. BUCKENMAIER. Active Solvent Modulation: A Valve-Based Approach to Improve Separation Compatibility in Two-Dimensional Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*. 2017, **89**(17), 9260-9267. Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02046>
- 6 NIEZEN, L. E., B. B. P. STAAL, C. LANG, B. J. W. PIROK a P. J. SCHOENMAKERS. Thermal modulation to enhance two-dimensional liquid chromatography separations of polymers. *Journal of Chromatography A*. 2021, **1653**(462429). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462429>
- 7 SAKHI, A. K., K. M. RUSSNES, S. SMELAND, R. BLOMHOFF a T. E. GUNDERSEN. Simultaneous quantification of reduced and oxidized glutathione in plasma using a two-dimensional chromatographic system with parallel porous graphitized carbon columns coupled with fluorescence and coulometric electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*. 2006, **1104**(1-2), 179–189. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.11.129>

- 8 ARMUTCU, C., E. ÖZGÜR, T. KARASU, E. BAYRAM, L. UZUN a M. E. ÇORMAN. Rapid Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Samples Using an Automated On-line Two-Dimensional Liquid Chromatography. *Water, Air, & Soil Pollution*. 2019, **230**(10), 249. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4306-7>
- 9 JIANG, X., A. van der HORST, V. LIMA a P. J. SCHOENMAKERS. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography for the characterization of functional acrylate polymers. *Journal of Chromatography A*. 2005, **1076**(1–2). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.135>
- 10 FA, Y., Y. YU, F. LI, F. DU, X. LIANG a H. LIU. Simultaneous detection of anions and cations in mineral water by two-dimensional ion chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2018, **1554**, 123–127. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.04.017>
- 11 STOLL, D.R., X. LI, X. WANG, P.W. CARR, S.E.G. PORTER a S.C. RUTAN. Fast, comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2007, **1168**(1-2), 3–43. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.08.054>
- 12 PIROK, B. W. J., M. J. den UIJL, G. MORO, S.V. J. BERBERS, C. J. M. CROES, M. R. van BOMMEL a P. J. SCHOENMAKERS. Characterization of Dye Extracts from Historical Cultural-Heritage Objects Using State-of-the-Art Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography and Mass Spectrometry with Active Modulation and Optimized Shifting Gradients. *Analytical Chemistry*. 2019, **91**(4), 3062–3069. Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05469>
- 13 CHEN, Y., L. MONTERO, J. LUO, J. LI a O. J. SCHMITZ. Application of the new at-column dilution (ACD) modulator for the two-dimensional RP×HILIC analysis of *Buddleja davidii*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2020, **412**(7), 1483–1495. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02392-3>
- 14 HUANG, Z., G. YAN, M. GAO a X. ZHANG. Array-Based Online Two-Dimensional Liquid Chromatography System Applied to Effective Depletion

- of High-Abundance Proteins in Human Plasma. *Analytical Chemistry*. 2016, **88**(4), 2440–2445. Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04553>
- 15 CACCIOLA, F., P. JANDERA, Z. HAJDÚ, P. ČESLA a L. MONDELLO. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography with parallel gradients for separation of phenolic and flavone antioxidants. *Journal of Chromatography A*. 2007, **1149**(1), 73–87. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.119>
- 16 MONDELLO, L., A. C. LEWIS a K. D. BARTLE. *Multidimensional Chromatography* [online]. England: John Wiley, 2002 [cit. 2022-09-28]. ISBN 0-470-84577-5. Dostupné z: <http://library.nuft.edu.ua/ebook/file/Mondello2002.pdf>
- 17 HERRERO, M., E. IBÁÑEZ, A. CIFUENTES a J. BERNAL. Multidimensional chromatography in food analysis. *Journal of Chromatography A*. 2009, **1216**(43), 7110–7129. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.08.014>
- 18 PIROK, B. W.J., A. F.G. GARGANO a P. J. SCHOENMAKERS. Optimizing separations in online comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Separation Science*. 2018, **41**(1), 68–98. Doi: <https://doi.org/10.1002/jssc.201700863>
- 19 ČESLA, P. a J. KŘENKOVÁ. Fraction transfer process in on-line comprehensive two-dimensional liquid-phase separations. *Journal of Separation Science*. 2017, **40**(1), 109–123. Doi: <https://doi.org/10.1002/jssc.201600921>
- 20 VENKATRAMANI, C. J. a Y. ZELECHONOK. Two-dimensional liquid chromatography with mixed mode stationary phases. *Journal of Chromatography A*. 2005, **1066**(1-2), 47–53. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.11.103>
- 21 TIAN, H., J. XU a Y. GUAN. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography (NPLC×RPLC) with vacuum-evaporation interface. *Journal of Separation Science*. 2008, **31**(10), 1677–1685. Doi: <https://doi.org/10.1002/jssc.200700559>
- 22 SAITO, H., Y. ODA, T. SATO, J. KUROMITSU a Y. ISHIHAMA. Multiplexed Two-Dimensional Liquid Chromatography for MALDI and Nanoelectrospray Ionization Mass Spectrometry in Proteomics. *Journal of Proteome Research*. 2006, **5**(7), 1803–1807. Doi: <https://doi.org/10.1021/pr0601178>

- 23 WEI, F., S. X. JI, N. HU, X. LV, X. Y. DONG, Y. Q. FENG a H. CHEN. Online profiling of triacylglycerols in plant oils by two-dimensional liquid chromatography using a single column coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2013, **1312**, 69–79. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.09.005>
- 24 DUGO, P., N. FAWZY, F. CICHELO, F. CACCIOLA, P. DONATO a L. MONDELLO. Stop-flow comprehensive two-dimensional liquid chromatography combined with mass spectrometric detection for phospholipid analysis. *Journal of Chromatography A*. 2013, **1278**, 46–53. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.042>
- 25 UIJL, M. J. den, T. ROELAND, T. S. BOS, P. J. SCHOENMAKERS, M. R. van BOMME a B. J. W. PIROK. Assessing the feasibility of stationary-phase-assisted modulation for two-dimensional liquid-chromatography separations. *Journal of Chromatography A*. 2022, **2022**(1679), 463388. ISSN 1873-3778. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463388>
- 26 CACCIOLA, F., P. DONATO, D. GIUFFRIDA, G. TORRE, P. DUGO a L. MONDELLO. Ultra-high pressure in the second dimension of a comprehensive two-dimensional liquid chromatographic system for carotenoid separation in red chili peppers. *Journal of Chromatography A*. 2012, **1255**, 244–251. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.06.076>
- 27 TANAKA, N., H. KIMURA, D. TOKUDA, et al. Simple and Comprehensive Two-Dimensional Reversed-Phase HPLC Using Monolithic Silica Columns. *Analytical Chemistry*. 2004, **76**(5), 1273–1281. Doi: <https://doi.org/10.1021/ac034925j>
- 28 FRANÇOIS, I., A. de VILLIERS, B. TIENPONT, F. DAVID a P. SANDRA. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography applying two parallel columns in the second dimension. *Journal of Chromatography A*. 2008, **1178**(1–2), 33–42. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.11.032>
- 29 GU, X., C. DENG, G. YAN a X. ZHANG. Capillary Array Reversed-Phase Liquid Chromatography-Based Multidimensional Separation System Coupled with MALDI-TOF-TOF-MS Detection for High-Throughput Proteome Analy-

- sis. *Journal of Proteome Research*. 2006, **5**(11), 3186–3196. Doi: <https://doi.org/10.1021/pr0602592>
- 30 PETERSSON, P., K. HASELMANN a S. BUCKENMAIER. Multiple heart-cutting two-dimensional liquid chromatography mass spectrometry: Towards real time determination of related impurities of bio-pharmaceuticals in salt-based separation methods. *Journal of Chromatography A*. 2016, **1468**, 95–101. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.09.023>
- 31 VERSTRAETEN, M., M. PURSCH, P. ECKERLE, J. LUONG a G. DESMET. Thermal Modulation for Multidimensional Liquid Chromatography Separations Using Low-Thermal-Mass Liquid Chromatography (LC). *Analytical chemistry*. 2011, **83**(18), 7053–7060. Doi: <https://doi.org/10.1021/ac201207t>
- 32 CREESE, M. E., M. J. CREESE, J. P. FOLEY, H. J. CORTES, E. F. HILDER, R. A. SHELLIE a M. C. BREADMORE. Longitudinal On-Column Thermal Modulation for Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*. 2017, **89**(2), 1123–1130. Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03279>
- 33 VONK, R. J., A. F. G. GARGANO, E. DAVYDOVA, H. L. DEKKER, S. EELTINK, L. J. de KONING a P. J. SCHOENMAKERS. Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography with Stationary-Phase-Assisted Modulation Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry Applied to Proteome Analysis of *Saccharomyces cerevisiae*. *Analytical Chemistry*. 2015, **87**(10), 5387–5394. Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00708>
- 34 ČESLA, Petr, Tomáš HÁJEK a Pavel JANDERA. Optimization of two-dimensional gradient liquid chromatography separations. *Journal of Chromatography A*. 2009, **1216**(16), 3443–3457. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.08.111>
- 35 JANDERA, P., T. HÁJEK a P. ČESLA. Comparison of various second-dimension gradient types in comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Separation Science*. 2010, **33**(10), 1382–1397. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.08.111>

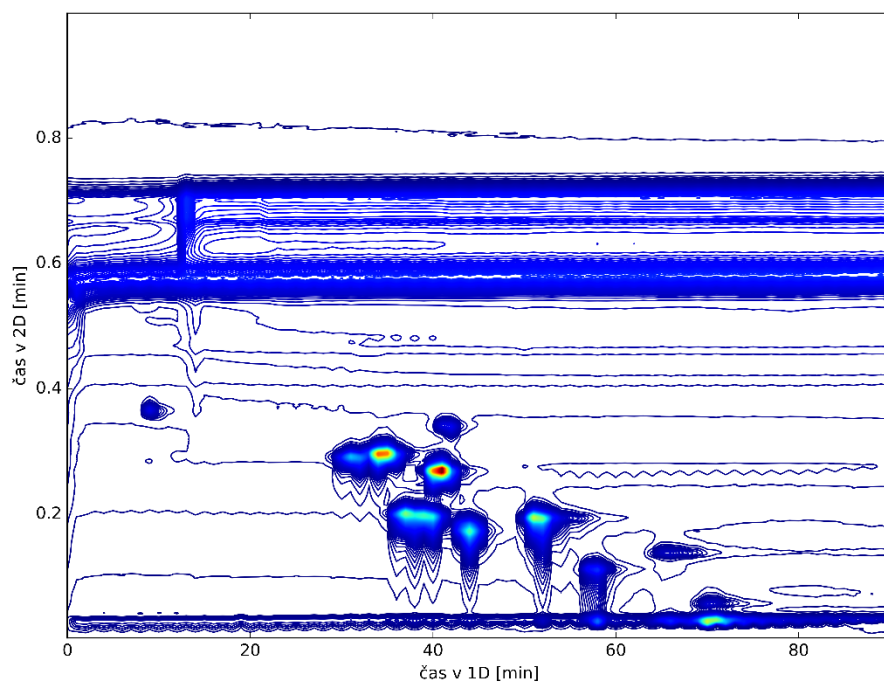
- 36 TRANCHIDA, P. Q., P. DONATO, F. CACCIOLA, M. BECCARIA, P. DUGO a L. MONDELLO. Potential of comprehensive chromatography in food analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. 2013, **52**, 186–205. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2013.07.008>
- 37 RAUSCH, A. K., R. BROCKMEYER a T. SCHWERDTLE. Development, validation, and application of a multi-method for the determination of mycotoxins, plant growth regulators, tropane alkaloids, and pesticides in cereals by two-dimensional liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2021, **413**(11), 3041–3054. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03239-1>
- 38 DANG, J., L. ZHANG, Q. WANG, et al. Target separation of flavonoids from *Saxifraga tangutica* using two-dimensional hydrophilic interaction chromatography/reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Separation Science*. 2018, **41**(24), 4419–4429. Doi: <https://doi.org/10.1002/jssc.201800534>
- 39 FU, Q., Z. GUO, X. ZHANG, Y. LIU a X. LIANG. Comprehensive characterization of *Stevia Rebaudiana* using two-dimensional reversed-phase liquid chromatography/hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Separation Science*. 2012, **35**(14), 1821–1827. Doi: <https://doi.org/10.1002/jssc.201101103>
- 40 KITTLAUS, S., J. SCHIMANKE, G. KEMPE a K. SPEER. Development and validation of an efficient automated method for the analysis of 300 pesticides in foods using two-dimensional liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2013, **1283**, 98–109. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.106>
- 41 WANG, L., B. YANG, X. ZHANG a H. ZHENG. Novel Two-Dimensional Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry for the Analysis of Twenty Antibiotics Residues in Dairy Products. *Food Analytical Methods*. 2017, **10**(6), 2001–2010. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0763-4>
- 42 CAMPONE, L., S. RIZZO, A. L. PICCINELLI, R. CELANO, I. PAGANO, M. RUSSO, M. LABRA a L. RASTRELLI. Determination of mycotoxins in beer by multi heart-cutting two-dimensional liquid chromatography tandem mass

- spectrometry method. *Food Chemistry*. 2020, **318**, 126496. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126496>
- 43 DUGO, P., D. GIUFFRIDA, M. HERRERO, P. DONATO a L. MONDELLO. Epoxycarotenoids esters analysis in intact orange juices using two-dimensional comprehensive liquid chromatography. *Journal of Separation Science*. 2009, **32**(7), 973–980. Doi: <https://doi.org/10.1002/jssc.200800696>
- 44 JANDERA, P., M. STAŇKOVÁ a T. HÁJEK. New zwitterionic polymethacrylate monolithic columns for one- and two-dimensional microliquid chromatography. *Journal of Separation Science*. 2013, **36**(15), 2430–2440. Doi: <https://doi.org/10.1002/jssc.201300337>
- 45 JANDERA, P., T. HÁJEK, M. STAŇKOVÁ, K. VYŇUCHALOVÁ a P. ČESLA. Optimization of comprehensive two-dimensional gradient chromatography coupling in-line hydrophilic interaction and reversed phase liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2012, 1268, 91–101. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.10.041>
- 46 JANDERA, P., T. HÁJEK a P. ČESLA. Effects of the gradient profile, sample volume and solvent on the separation in very fast gradients, with special attention to the second-dimension gradient in comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2011, **1218**(15), 1995-2006. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.095>
- 47 RODRIGUEZ-DIAZ, R., T. WEHR a M. ZHU. Capillary isoelectric focwsing. *Electrophoresis*. John Wiley, 1997, **18**(12-13), 2134-2144. ISSN 1522-2683. Doi: <https://doi.org/10.1002/elps.1150181204>

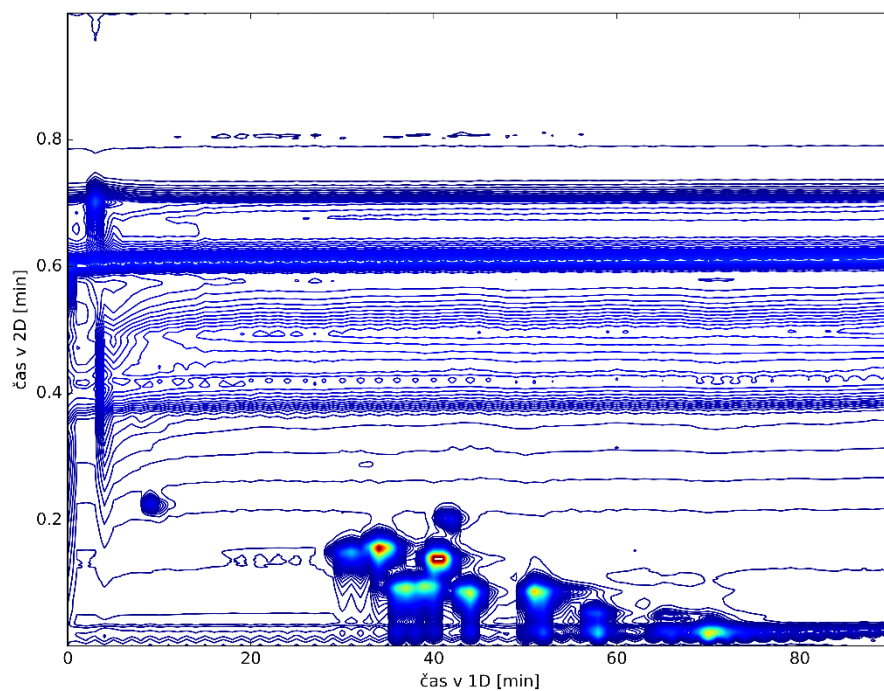
6 Seznam příloh

Příloha 1 – Duo čtyřcestný dvoupolohový ventil se smyčkami.....	115
Příloha 2 – Duo čtyřcestný dvoupolohový ventil s kolonkami HILIC	117
Příloha 3 – Duo čtyřcestný dvoupolohový ventil s kolonkami C18 5×2,1 mm ..	120
Příloha 4 – Duo čtyřcestný dvoupolohový ventil s kolonkami C18 20×4 mm ...	123
Příloha 5 – Modulace ředěním na koloně	126
Příloha 6 – Třísmyčkový modulátor	128
Příloha 7 – Hledání ideálních podmínek pro aplikaci izoelektrické fokusace.....	130
Příloha 8 – Izoelektrická fokusace.....	132

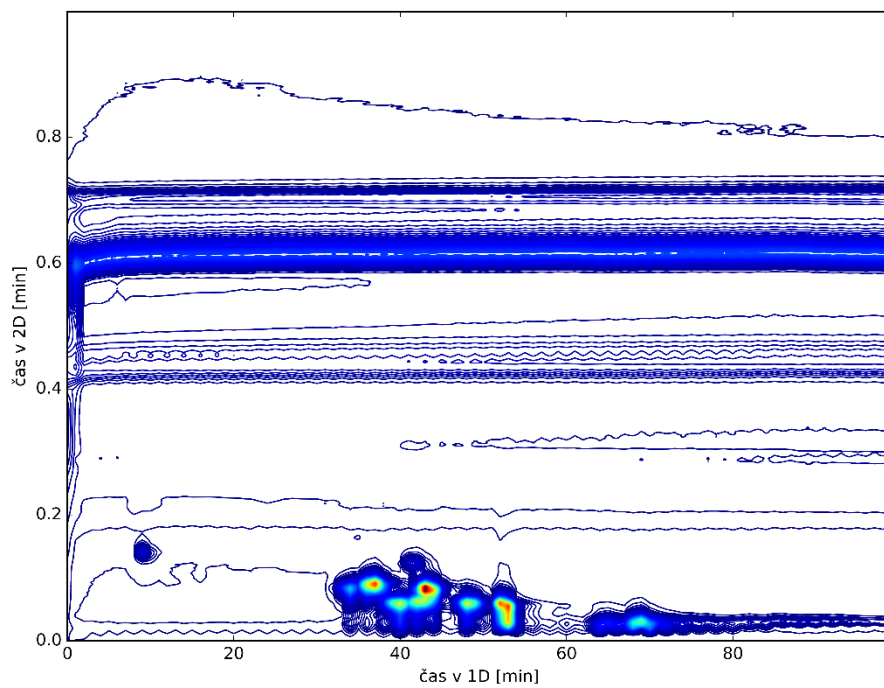
Příloha 1 – Duo čtyřcestný dvoupolohový ventil se smyčkami



Obrázek P1.1: 2D chromatogram fenolických kyselin s nastaveným gradientem ve druhé dimenzi 10–50 % acetonitrilu a se zapojeným AG-smyčkami.

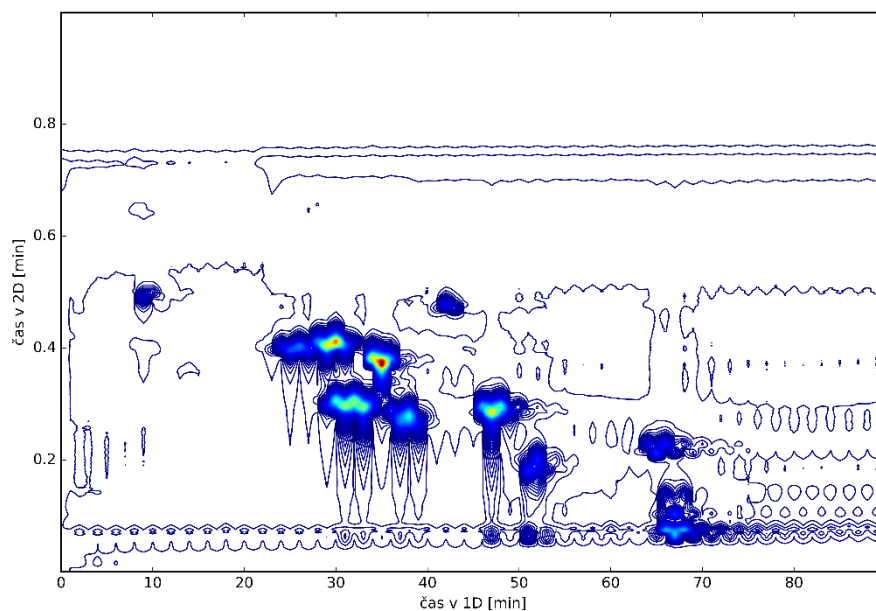


Obrázek P1.2: 2D chromatogram fenolických kyselin při zapojení AG ventilu se smyčkami a s gradientem 20–60 % acetonitrilu v mobilní fázi.

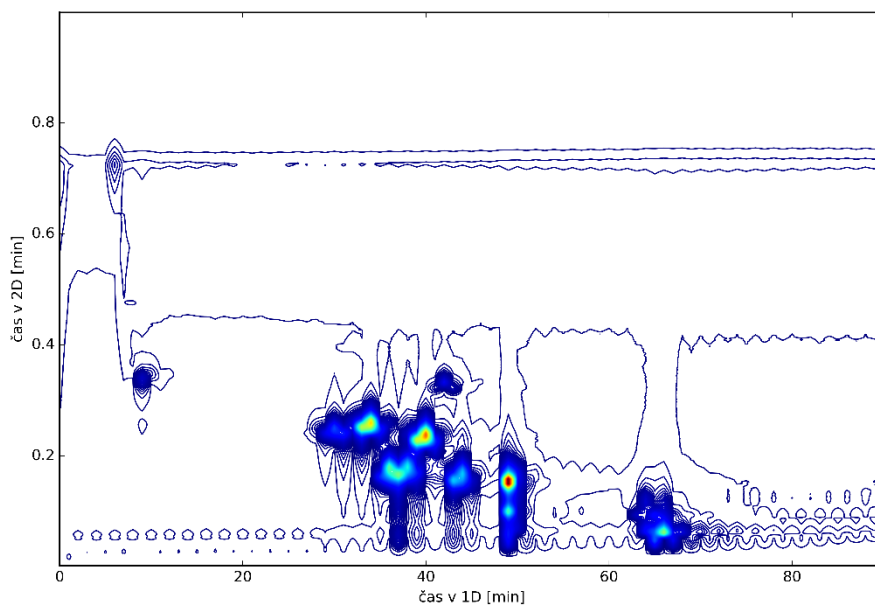


Obrázek P1.3: 2D chromatogram fenolických kyselin při zapojení duo čtyřcestného dvoupolohového ventilu se zachytávacími smyčkami a při nastaveném gradientu acetonitrilu 30–70 %.

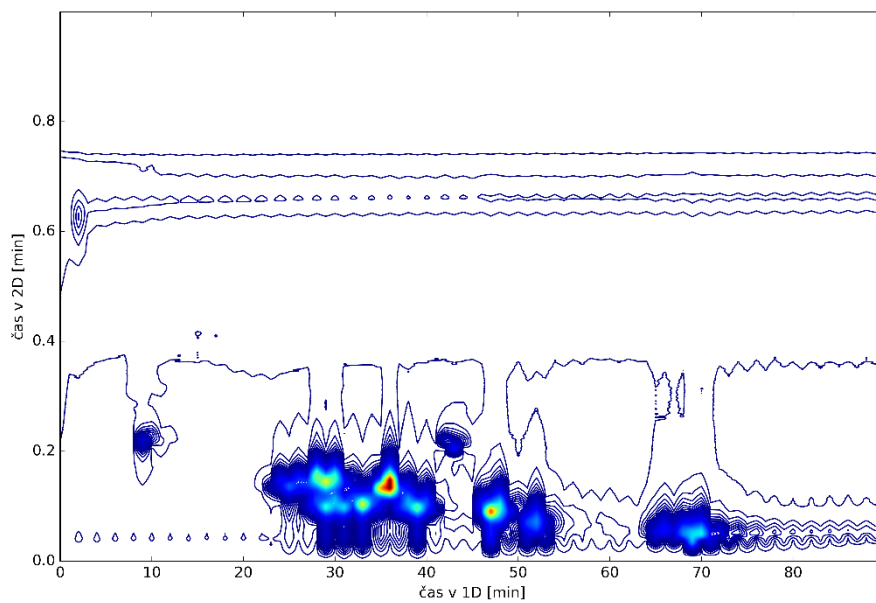
Příloha 2 – Duo čtyřcestný dvoupolohový ventil s kolonkami HILIC



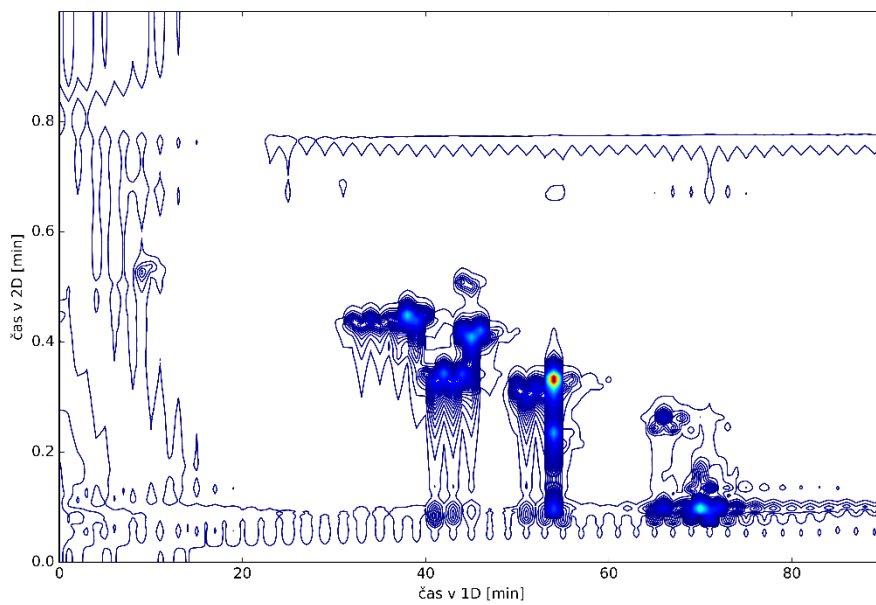
Obrázek P2.1: 2D chromatogram fenolických kyselin při zapojení duo čtyřcestného dvoupolohového ventilu s trapovacími kolonkami HILIC po směru. Gradient byl nastaven od 10–50 % acetonitrilu v mobilní fázi.



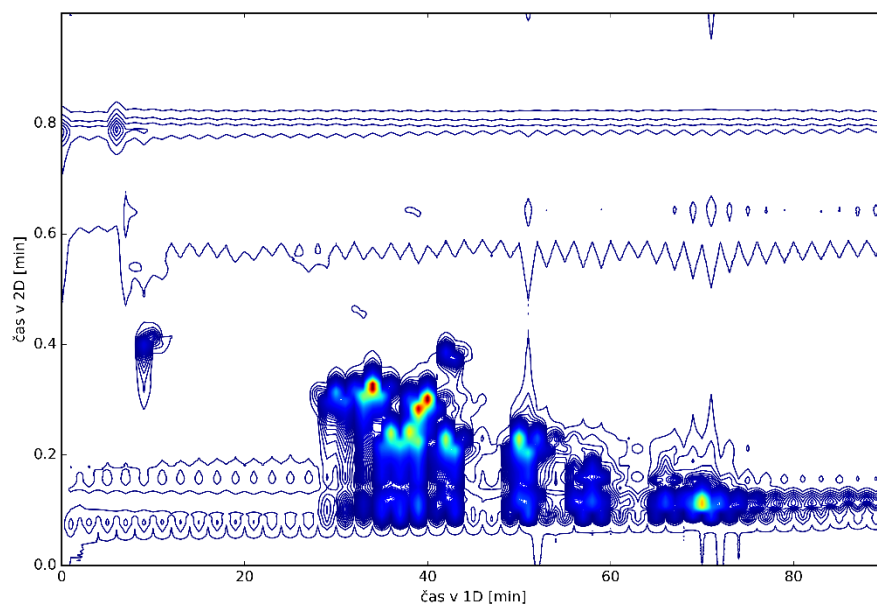
Obrázek P2.2: 2D chromatogram fenolických kyselin při zapojení HILIC kolonek na AG a s koncentrací acetonitrilu 20–60 %.



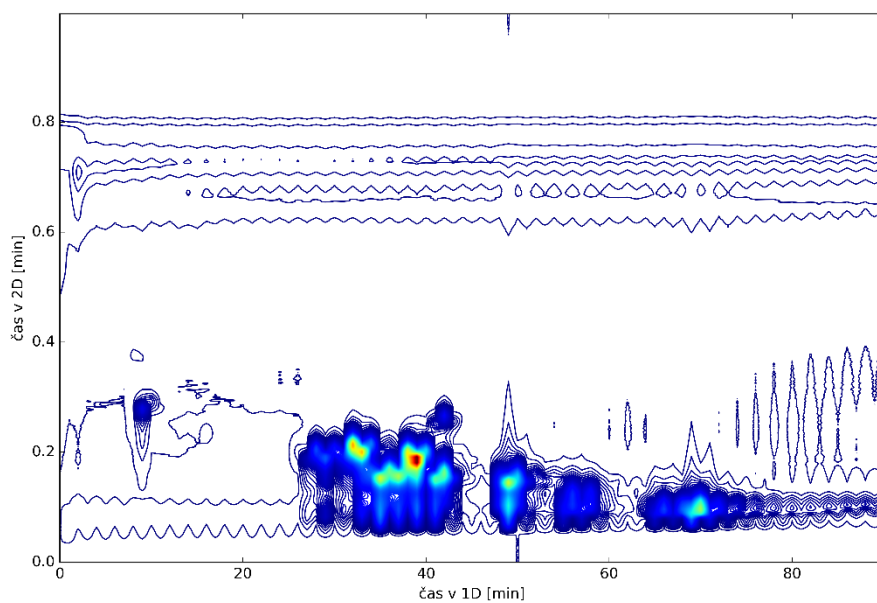
Obrázek P2.3: 2D chromatogram fenolických kyselin při zapojení AG-trapHILIC po směru a při koncentraci MF(B)_{D2} 30–70 %.



Obrázek P2.4: 2D chromatogram fenolických kyselin při gradientu 10–50 % acetonitrilu v mobilní fázi a zapojení zachytávacích kolonek HILIC na AG ventil v protisměru.

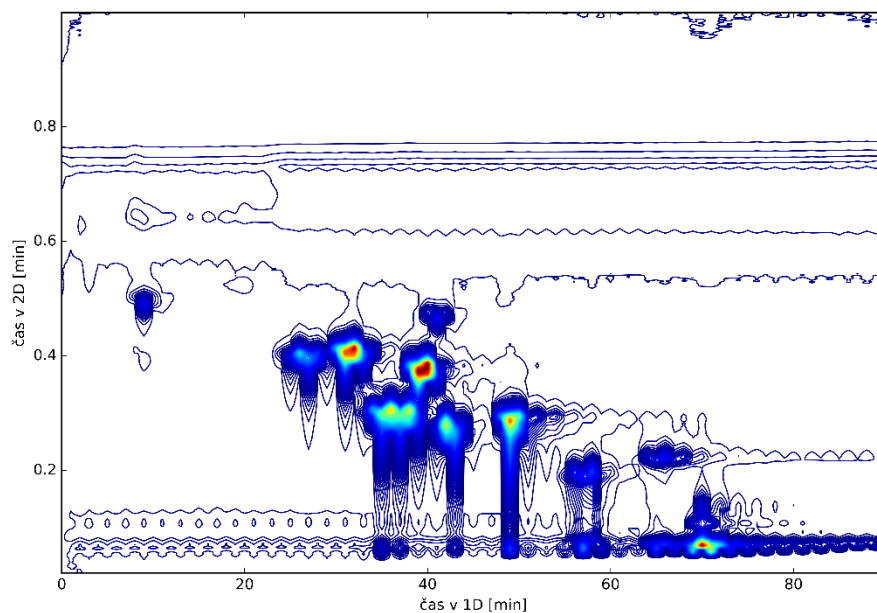


Obrázek P2.5: 2D chromatogram fenolických kyselin při gradientu 20–60 % acetonitrilu a zapojení kolonek HILIC na AG do protisměru.

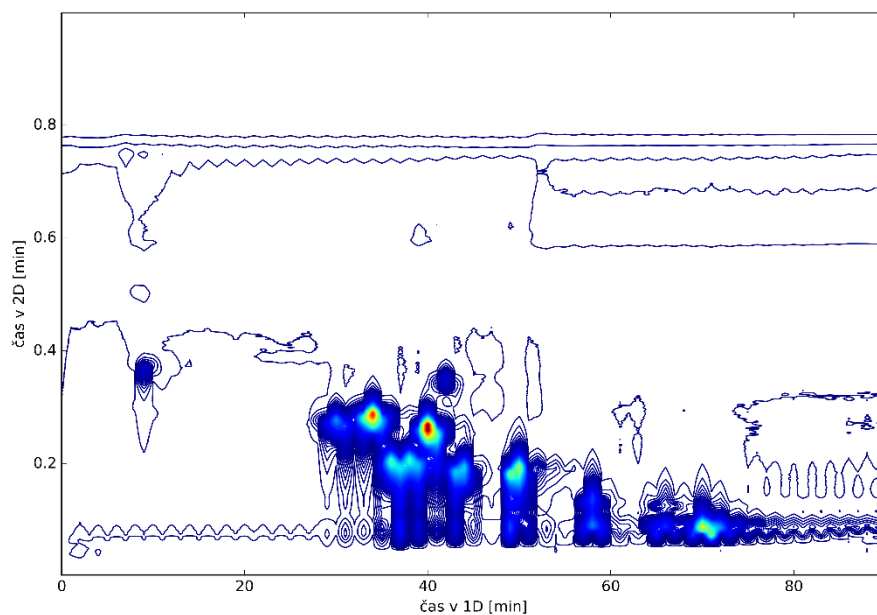


Obrázek P2.6: 2D chromatogram fenolických kyselin při zapojení HILIC kolonek do protisměru na duo čtyřcestný dvupolohový ventil a nastaveném gradientu MF(B)_{D2} 30–70 %.

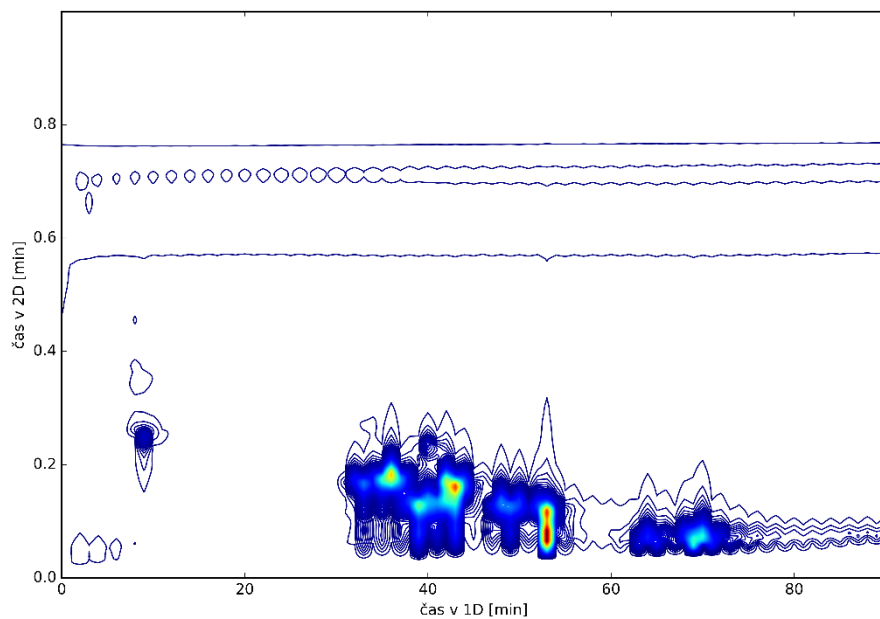
Příloha 3 – Duo čtyřcestný dvoupolohový ventil s kolonkami C18 5×2,1 mm



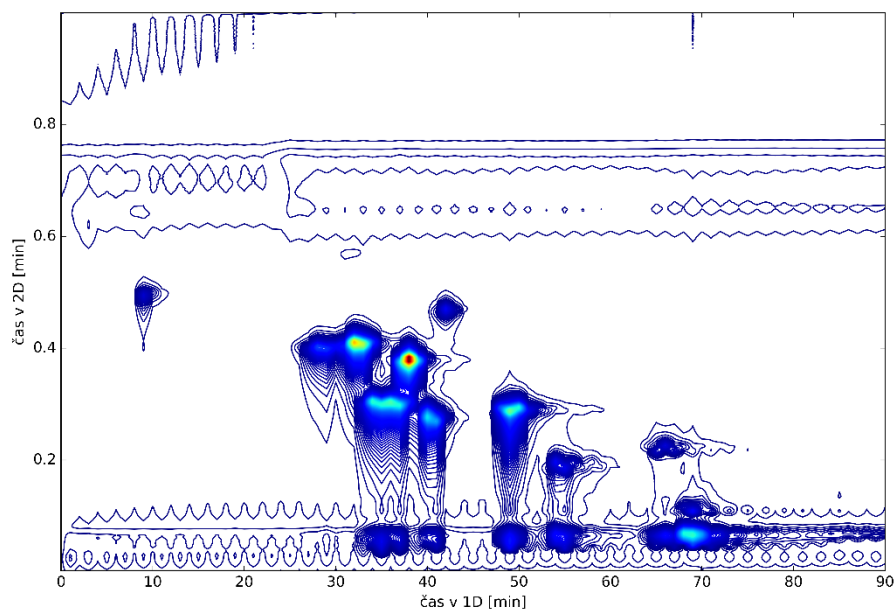
Obrázek P3.1: 2D chromatogram fenolických kyselin s gradientem 10–50 % acetonitrilu v mobilní fázi a zapojením AG-trapC18-5 po směru.



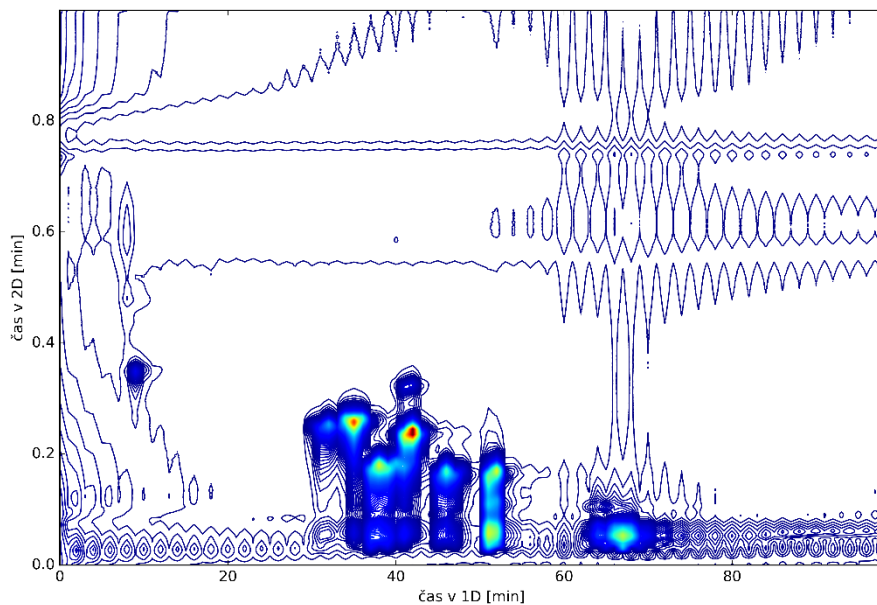
Obrázek P3.2: 2D chromatogram fenolických kyselin při zapojení kolonek C18-5 po směru a s gradientem 20–60 % acetonitrilu v mobilní fázi.



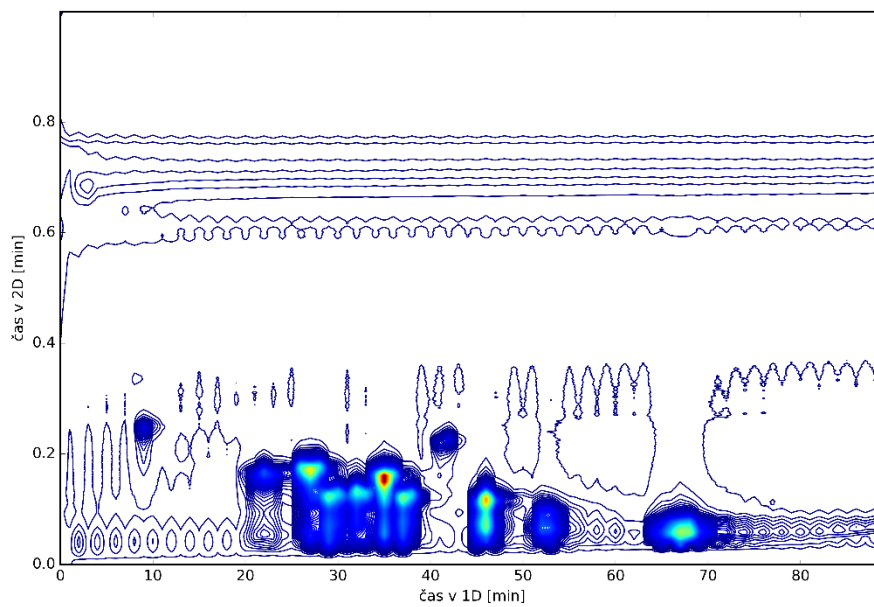
Obrázek P3.3: 2D chromatogram fenolických kyselin získaný při gradientu 30–70 % acetonitrilu v mobilní fázi a zapojení AG-trapC18-5 modulátoru po směru.



Obrázek P3.4: 2D chromatogram fenolických kyselin při nastaveném gradientu 10–50 % MF(B)_{D2} a zapojení trapovacích kolonek C18-5 na AG ventil do protisměru.

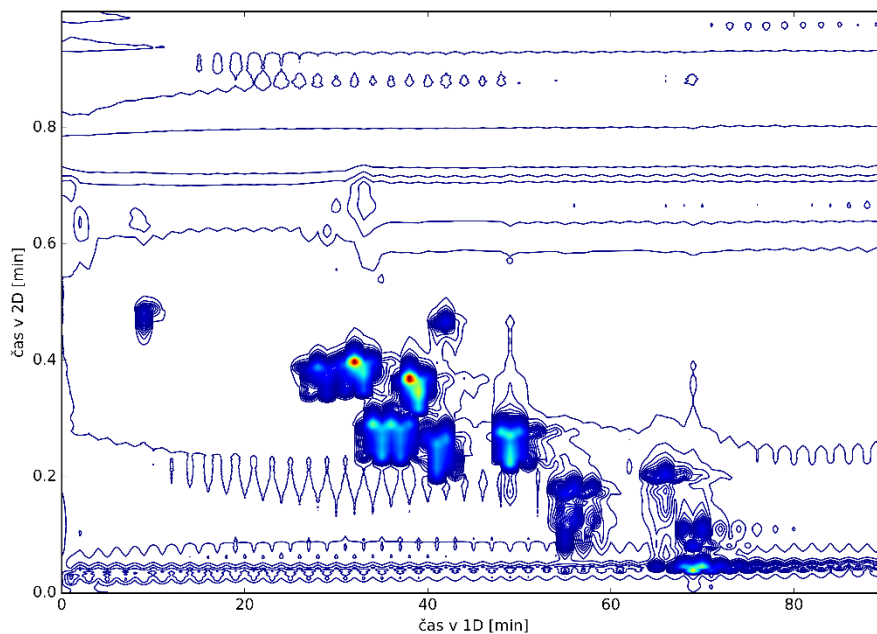


Obrázek P3.5: 2D chromatogram fenolických kyselin při zapojení duo čtyřcestného dvoupolohového ventilu s trapovacími kolonkami C18-5 v protisměru s nastaveným gradientem acetonitrilu 20–60 % v mobilní fázi.

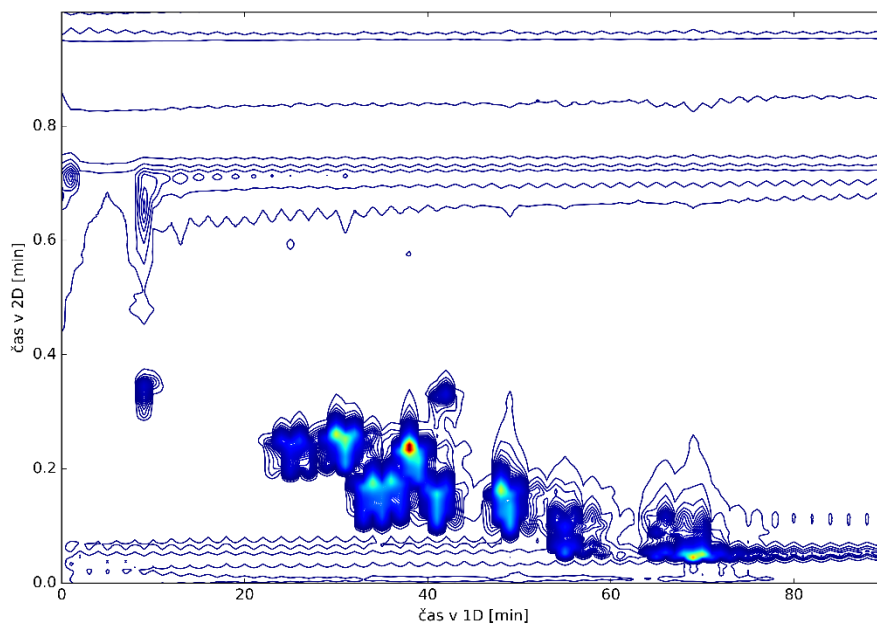


Obrázek P3.6: 2D chromatogram fenolických kyselin při zapojení zachytávacích kolonek C18-5 na AG ventil v protisměru a při nastavení gradientu 30–70 % acetonitrilu v mobilní fázi MF(A)_{D2}.

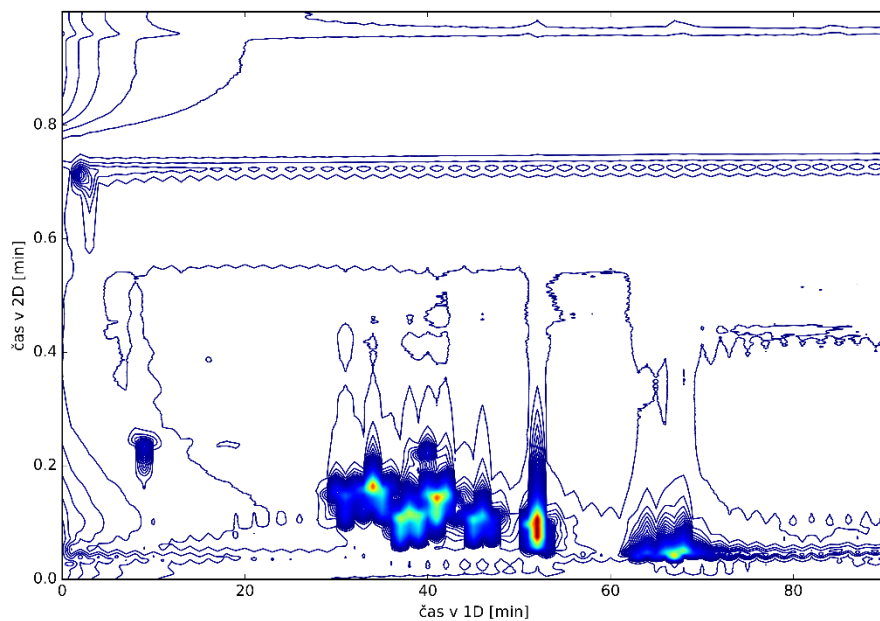
Příloha 4 – Duo čtyřcestný dvoupolohový ventil s kolonkami C18 20×4 mm



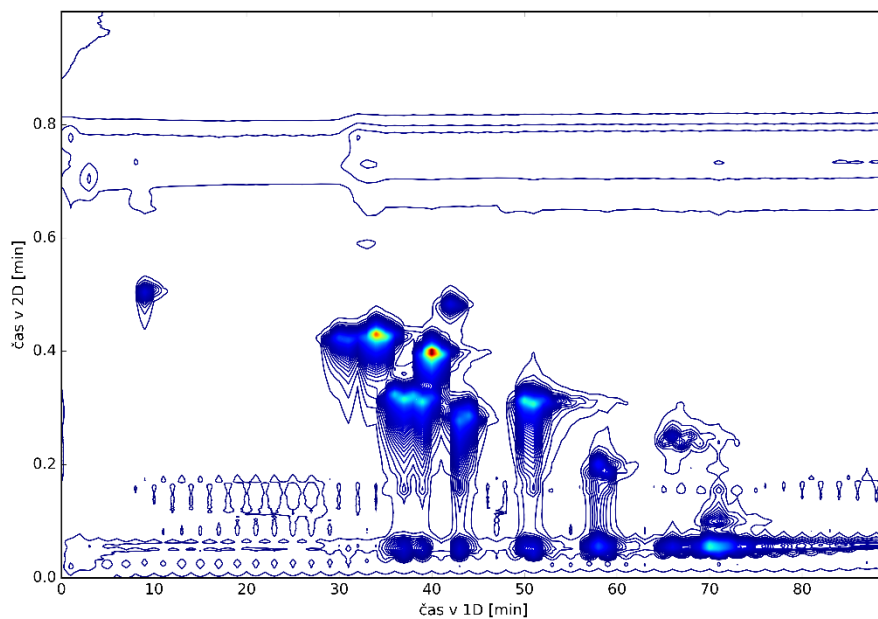
Obrázek P4.1: 2D chromatogram fenolických kyselin se zapojením trapovacích kolonek C18 o délce 20 mm na AG ventil po směru při nastaveném gradientu 10–50 % acetonitrilu.



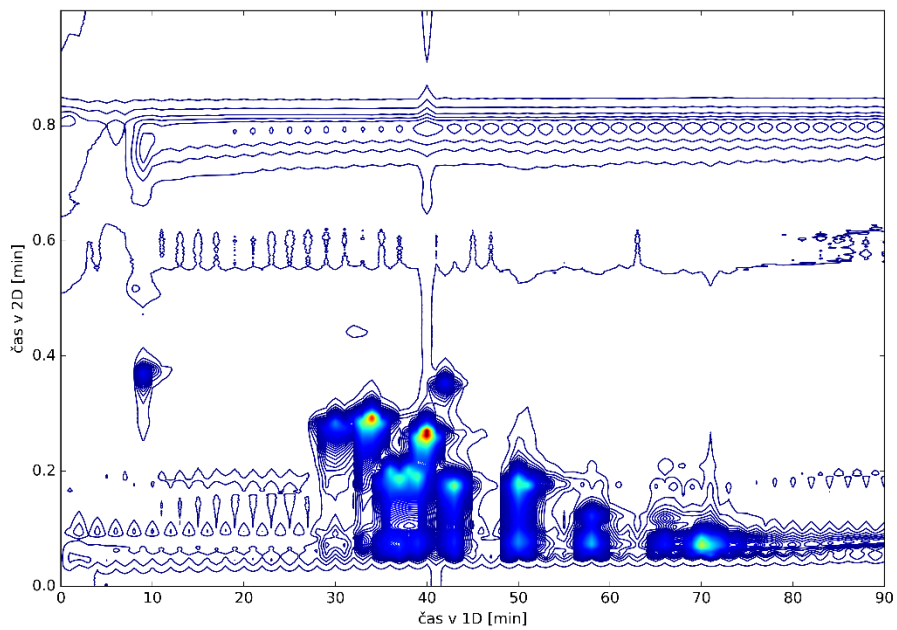
Obrázek P4.2: 2D chromatogram fenolických kyselin při zapojení AG-trapC18-20 po směru a s nastaveným gradientem od 20 do 60 % acetonitrilu v mobilní fázi.



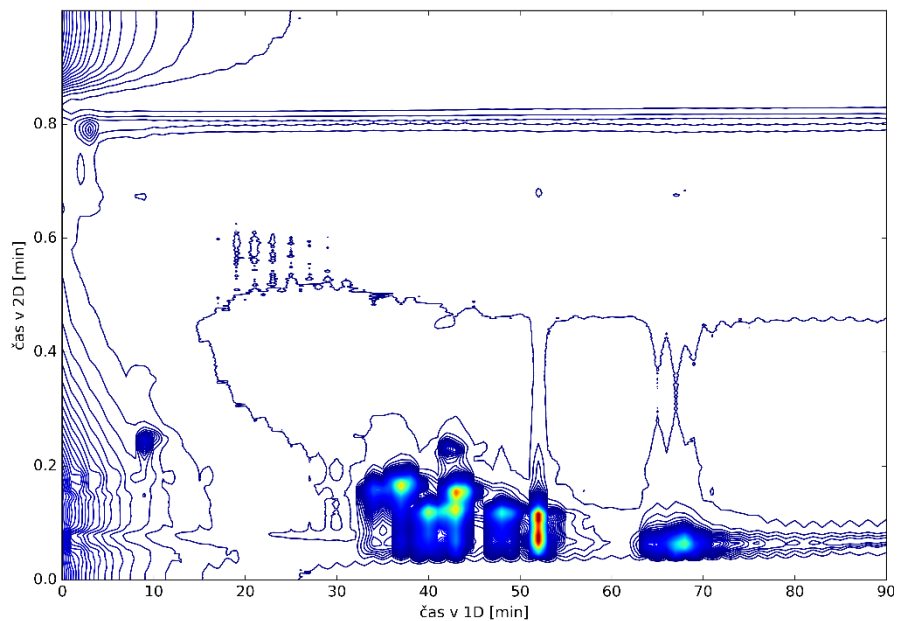
Obrázek P4.3: 2D chromatogram fenolických kyselin získaný při separaci se zachytávacími kolonkami C18 o délce 20 mm zapojených na AG ventil po směru a s nastaveným gradientem od 30 do 70 % acetonitrilu v mobilní fázi.



Obrázek P4.4: 2D chromatogram fenolických kyselin při použití gradientu 10–50 % a zapojení AG-trapC18-20 do protisměru.

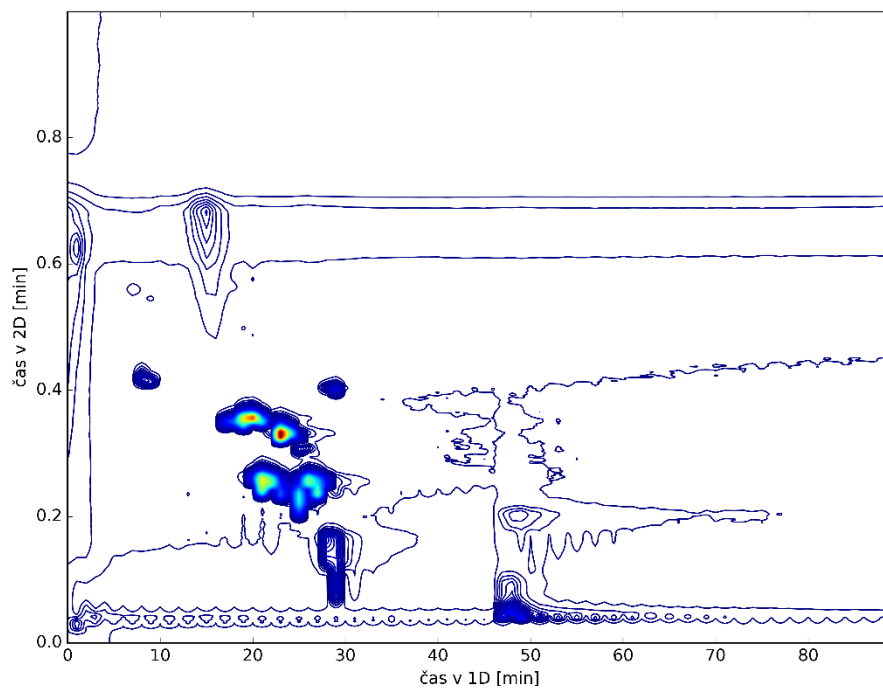


Obrázek P4.5: 2D chromatogram při zapojení kolonek C18-20 do protisměru na duo čtyřcestném dvoupolohovém ventilu a při gradientu 20–60 % acetonitrilu v mobilní fázi.

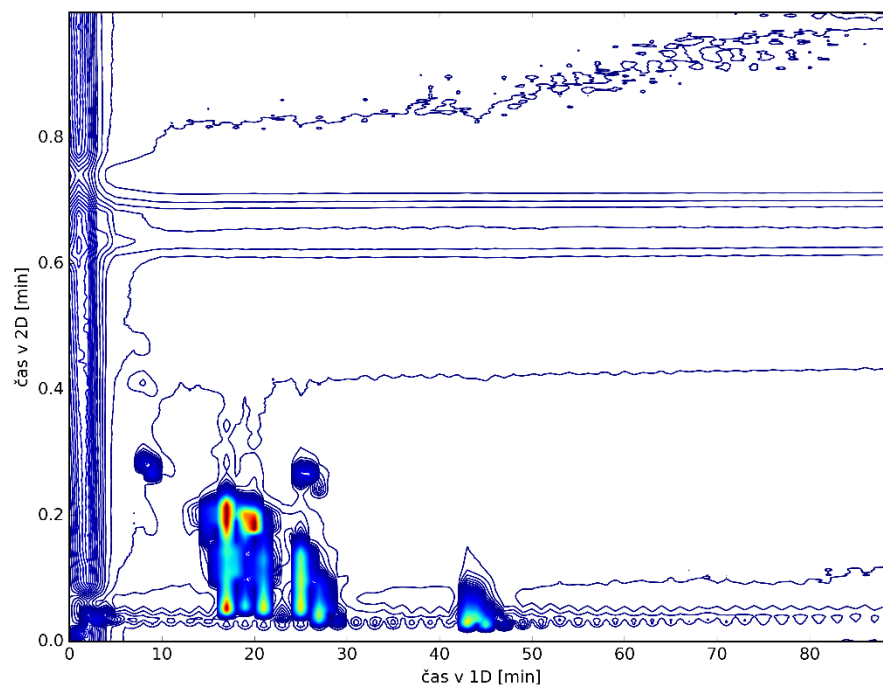


Obrázek P4.6: 2D chromatogram fenolických kyselin při zapojení AG-trapC18-20 modulátoru v protisměru a s gradientem 30–70 % MF(B)_{D2}.

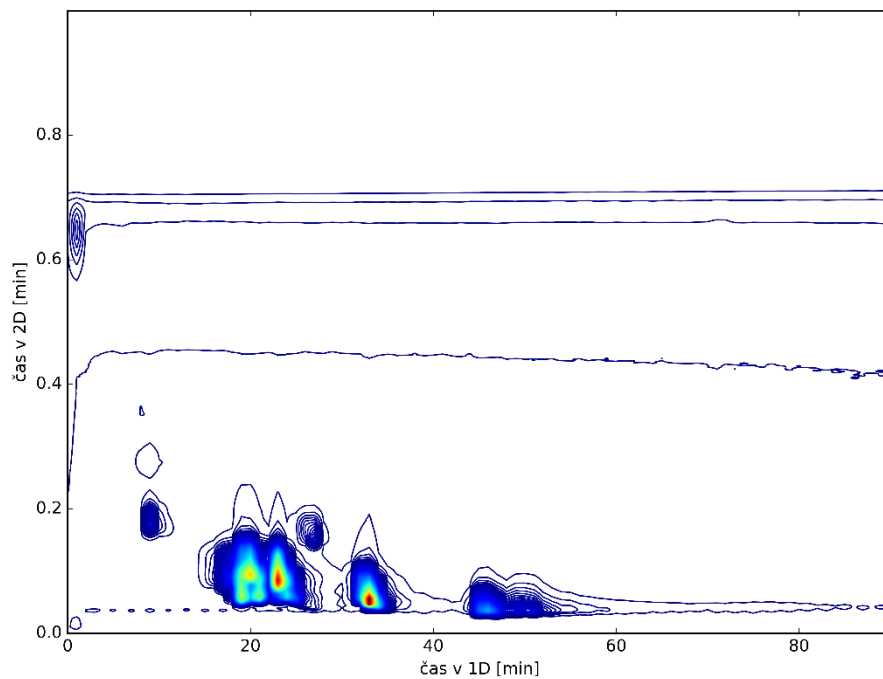
Příloha 5 – Modulace ředěním na koloně



Obrázek P5.1: 2D chromatogram fenolických kyselin při použití modulace ředěním na koloně a při gradientu 10–50 % acetonitrilu v mobilní fázi.

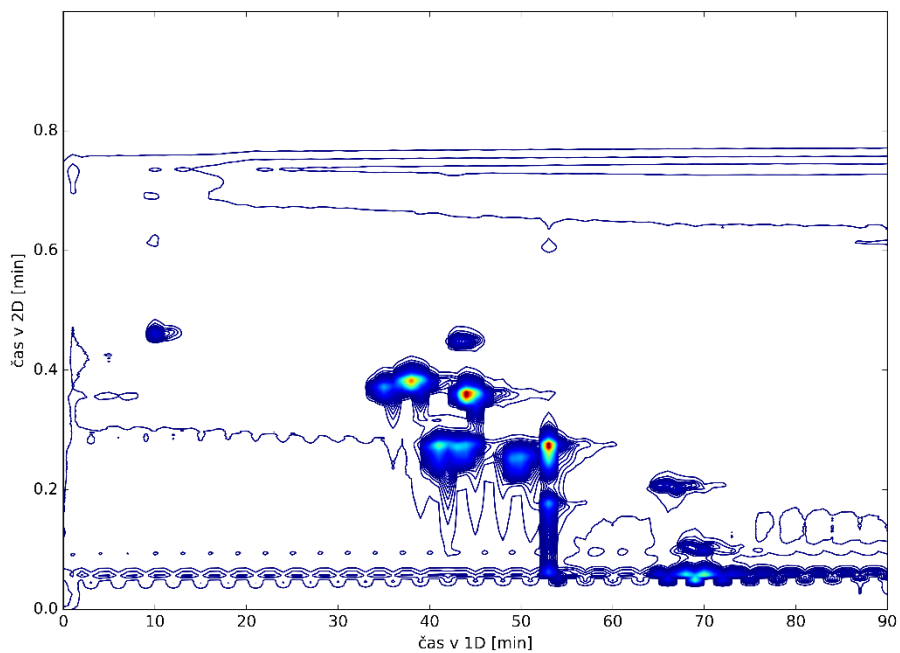


Obrázek P5.2: 2D chromatogram fenolických kyselin při gradientu acetonitrilu od 20 do 60 % a zapojení ACD.

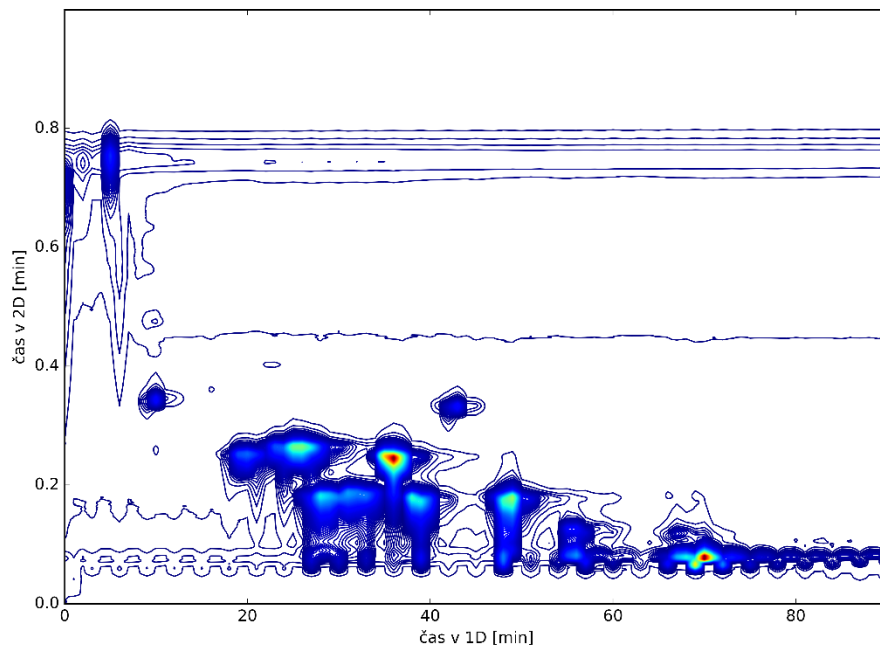


Obrázek P5.3: 2D chromatogram separace fenolických kyselin při zapojení modulace ředěním na koloně a nastaveném gradientu 30–70 % acetonitrilu v mobilní fázi.

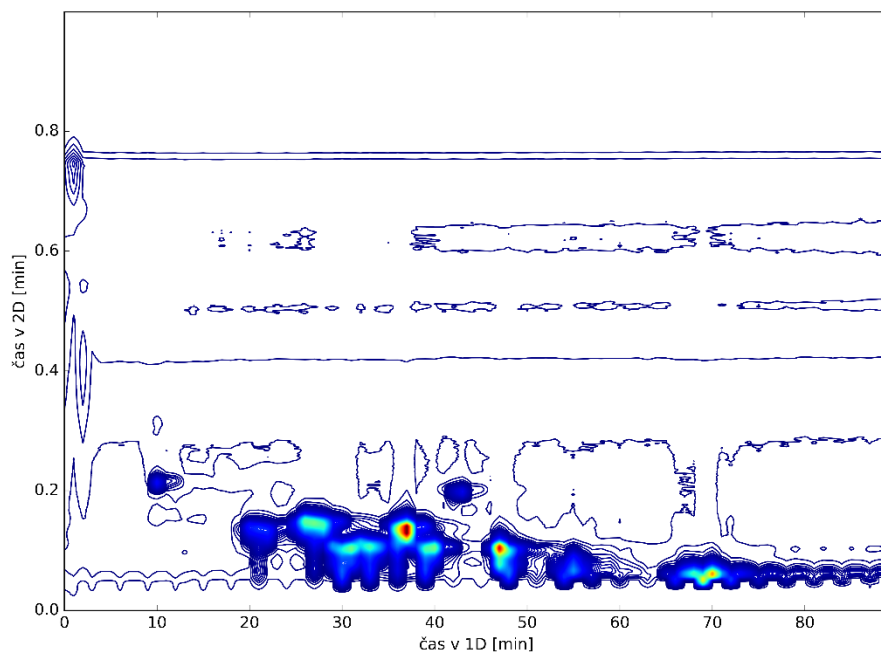
Příloha 6 – Třísmyčkový modulátor



Obrázek P6.1: 2D chromatogram fenolických kyselin při separaci s koncentrací acetonitrilu od 10 % do 50 % a se zapojeným třísmyčkovým modulátorem se třemi zachytávacími smyčkami.



Obrázek P6.2: 2D chromatogram fenolických kyselin při zapojení třísmyčkového modulátoru se smyčkami a nastaveném gradientu acetonitrilu ve druhé dimenzi 20–60 %.



Obrázek P6.3: 2D chromatogram separace fenolických kyselin při zapojení třísmýčkového modulátoru se smyčkami a nastaveném gradientu 30–70 % acetonitrilu v mobilní fázi.

Příloha 7 – Hledání ideálních podmínek pro aplikaci izoelektrické fokusace

Tabulka P7.1: Optimalizace tlaku dusíku.

$p_{\text{dusík}}$ [bar]	$t_{\text{od vialky k cele detektoru}}$ [s]
2	5,7
3	3,8
4	3,2
5	3,0

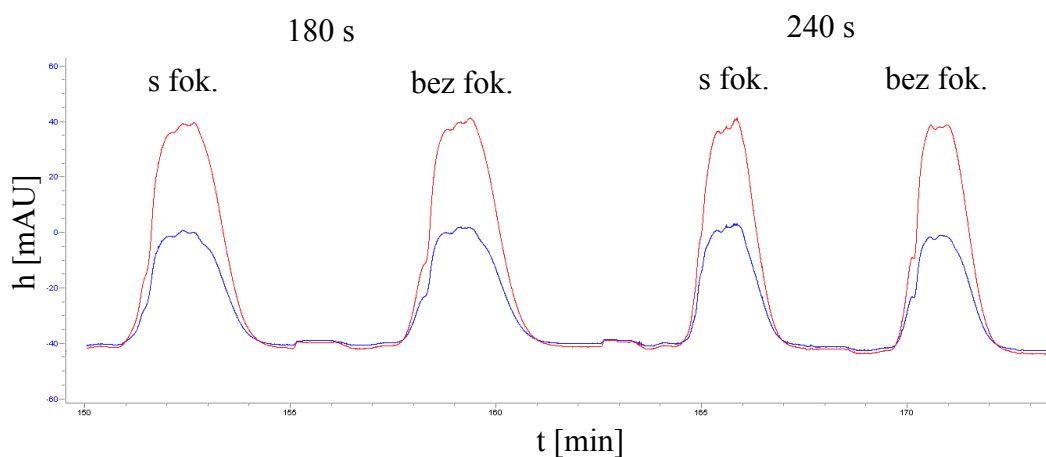
Tabulka P7.2: Stanovené a dopočítané parametry pro optimální nastavení injekční pumpy a vytlačení frakce z kapiláry elektroforézy zpět do smyčky.

parametr	„flush“	Tlak dusíku	
		kapilára 75 cm	kapilára 120 cm
$t_{\text{od vialky k okénku}}$ [s]	14,0	3,0	3,0
$d_{\text{kapiláry}}$ [μm]	75,0	75,0	75,0
$l_{\text{kapiláry}}$ [cm]	75,0	75,0	120,0
$V_{\text{kapiláry}}$ [μl]	3,3	3,3	5,3
$l_{\text{od vialky k detektoru}}$ [cm]	25,0	25,0	25,0
$V_{\text{kapiláry od detektoru k vialce}}$ [μl]	1,1	1,1	1,1
$V_{\text{smyčky}}$ [μl]	4,5	4,5	4,5
$l_{\text{kapiláry od smyčky k detektoru}}$ [cm]	50,0	50,0	95,0
$V_{\text{kapiláry od PEEK ventilu k detektoru}}$ [μl]	2,2	2,2	4,2
$V_{\text{kapiláry + smyčky}}$ [μl]	6,7	6,7	8,7
F_m od vialky k detektoru [$\mu\text{l}/\text{min}$]	4,7	22,0	22,0
$V_{\text{od smyčky po vialku}}$ [μl]	7,8	7,8	9,8
$t_{\text{od smyčky po vialku}}$ [min]	1,7	0,4	0,4
$t_{\text{od smyčky po vialku}}$ [s]	99,3	21,3	26,7
$t_{\text{od smyčky před detektor}}$ [min]	1,4	0,3	0,4
$t_{\text{od smyčky před detektor}}$ [s]	85,3	18,3	23,7
$V_{\text{potřebný pro vytlačení frakce z kapiláry ELFO do smyčky}}$ [μl]	6,7	6,7	8,8
p [bar]	0,9	5,0	5,0

Tabulka P7.3: Získané plochy piků kyseliny protokatechuové a kyseliny p-kumarové při různé dlouhé aplikaci dusíku v kapilární elektroforéze.

t_N [s]	$A_{\text{kyselina protokatechuová}} [\text{mAU}\cdot\text{s}]$			$A_{\text{kyselina p-kumarová}} [\text{mAU}\cdot\text{s}]$		
	<i>ve smyčce</i>	<i>mimo smyčku</i>	<i>součet</i>	<i>ve smyčce</i>	<i>mimo smyčku</i>	<i>součet</i>
0	112,1		112,1	4370,6		4370,6
	105,9		105,9	4268,0		4268,0
	112,1		112,1	4205,5		4205,5
12	1,7	2,4	4,1	63,8	98,9	162,7
17	2,8	3,8	6,6	107,3	166,9	274,2
22	10,4	15	25,4	397,9	554,6	952,5
27	30,9	28,7	59,6	1116,1	858,6	1974,7
32	45,9	16,7	62,6	1470,7	581,8	2052,5
	45,7	18,6	64,3	1670,9	648,9	2319,8
	36,4	14,7	51,1	1401,4	567,7	1969,1
35	45,4	15,8	61,2	1609,1	605,1	2214,2
	44,3	14,8	59,1	1559,8	576,5	2136,3
	37,5	10,5	48,0	1295,8	400,3	1696,1
	36,5	9,5	46,0	1350,4	419,7	1770,1
37	44,9	14,8	59,7	1587,1	670,9	2258,0
	44,1	18,6	62,7	1566,9	765,8	2332,7
	38,4	11,38	50,2	1374,7	468,6	1843,3
42	29,6	27,1	56,7	1034,9	975,1	2010,0

Příloha 8 – Izoelektrická fokusace



Obrázek P8.1: Záznamy signálů kyseliny protokatechuové a kyseliny p-kumarové při aplikaci napětí -25 kV po dobu 180 nebo 240 s. Na injekční pumpě byl průtok při vytlačování frakce z kapiláry do cely detektoru nastaven na $2\ \mu\text{l}/\text{min}$. Zkratka s fok. znamená, že na kapiláru bylo aplikováno napětí na kapiláru. Zkratka bez fok. znamená, že na kapiláru nebylo vloženo napětí, ale roztok setrval v kapiláře po daný čas.